



TESIS DOCTORAL

**MAPA DE DESTINO Y ESTUDIO DE VÍAS DE
SEÑALIZACIÓN EN EL DESARROLLO DEL
OÍDO INTERNO DE POLLO**

LUIS ÓSCAR SÁNCHEZ GUARDADO

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y ZOOLOGÍA

Conformidad de los Directores:

Fdo: Matías Hidalgo Sánchez

Fdo: Lucía Rodríguez Gallardo

2012

**AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN
DE LA
TESIS DOCTORAL**

MATÍAS HIDALGO SÁNCHEZ, PROFESOR TITULAR DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA, Y

LUCÍA RODRÍGUEZ GALLARDO, PROFESORA TITULAR DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada: “**Mapa de destino y estudio de vías de señalización en el desarrollo del oído interno de pollo**”, de la que es autor el Ldo. **Luis Óscar Sánchez Guardado** ha sido realizada en el Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología de la Universidad de Extremadura bajo sus direcciones.

Revisado el presente trabajo, los Directores consideran que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el tribunal que se designe al efecto, por lo que:

AUTORIZAN la presentación de la Tesis Doctoral para su defensa.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expedimos la presente certificación en Badajoz a 05 de Septiembre de 2012.

Fdo.: **Matías Hidalgo Sánchez**

Fdo.: **Lucía Rodríguez Gallardo**

Esta tesis doctoral fue realizada por el que suscribe en el Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura, y ha sido financiada por los siguientes proyectos:

TITULO DEL PROYECTO: Origen y especificación molecular de los elementos sensoriales en el desarrollo del oído interno.

ENTIDAD FINANCIADORA: Dirección General de Investigación (Plan nacional I+D+I 2004-2007; BFU2010-19461).

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Matías Hidalgo Sánchez

TITULO DEL PROYECTO: Función de los factores de transcripción Irx en el desarrollo del rombencéfalo y placoda ótica

ENTIDAD FINANCIADORA: Dirección General de Investigación (Plan nacional I+D+I 2004-2007). (BFU2006-15330-C02-02/BFI)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Lucía Rodríguez Gallardo

Durante el periodo de realización de esta Tesis Doctoral, he disfrutado de las siguientes becas:

Beca de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación para no doctores. Subprograma de la Consejería de Sanidad y Consumo.

Becas y contratos en prácticas para la formación predoctoral de personal investigador. Junta de Extremadura.

Contratos puente para becarios predoctorales. Universidad de Extremadura.

Fdo.: Luis Óscar Sánchez Guardado

Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas

(Santiago Ramón y Cajal)

*Se debe hacer todo tan sencillo como sea posible,
pero no más sencillo*

(Albert Einstein)

AGRADECIMIENTOS

Con estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que durante todos estos años me han apoyado y ayudado en mi trayectoria profesional, y que de una u otra forma han contribuido en la realización de la presente Tesis Doctoral.

En primer lugar, mostrar mi gratitud a mis directores de Tesis Dr. Matías Hidalgo Sánchez y Dra. Lucía Rodríguez Gallardo por darme la oportunidad de realizar esta Tesis. En especial al Dr. Matías Hidalgo Sánchez, director de Tesis, por su exquisito trato, su enorme paciencia, su disposición a resolver dudas y debatir resultados, así como por transmitirme sus conocimientos y sabiduría, no solo en lo profesional sino también en lo personal, durante estos años. Agradecer a mi codirectora de Tesis, Dra. Lucía Rodríguez Gallardo, por su asesoramiento, amistad y confianza depositada en mí. Gracias a ambos.

También quiero expresar mi agradecimiento a todos los profesores del Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, que desde que comencé con mi Tesis me han demostrado su confianza, amistad, ayuda desinteresada y buen ambiente, que han sido tan necesarios para recorrer este camino.

Sinceramente agradecer a todos los miembros del grupo de investigación de Luis Puelles, del Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, por hacer que me sintiera como en casa durante la estancia realizada en su laboratorio. Al Dr. Luis Puelles por apoyar siempre el trabajo realizado y colaborar con su sabiduría. Resaltar a Chelo, ese argentino que desde el primer día que coincidí en el laboratorio, siempre me ha transmitido su entusiasmo sobre la ciencia y el buen hacer de las cosas. A Luisa por su consejos y estar siempre dispuesta a ayudar. Mencionar al resto de miembros del laboratorio por su compañerismo, Juanu, Antonia, Rubén, Paloma, Abdu, Margaret....

Del mismo modo, agradezco al grupo de Ruth Díez del Corral y Aixa Morales, del Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo del Instituto Cajal de Madrid, por acogerme en su laboratorio de manera tan afectuosamente. Nombrar a Ale, por su compañerismo durante toda mi estancia. También reseñar el trato recibido por los becarios del Instituto Cajal, Oscar, Irene, Ramiro, Chala,.....

Mencionar al Dr. Manuel Ramírez por su buena disposición siempre para utilizar su material. Así como al Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencia (STAB), de la Universidad de Extremadura por los trabajos realizados. Me gustaría enfatizar mi agradecimiento a María Salud Holguín por la ayuda prestada con el criostato en muchos momentos de este trabajo

Hacer mención especial de gratitud a María Jesús Serrano Azuaga, secretaria del Área de Biología Celular, por su disponibilidad y ayuda desinteresada en todo momento.

Deseo también expresar mi agradecimiento a los compañeros con los que he compartido mi espacio de trabajo, por su apoyo incondicional y su participación de manera desinteresada. En especial a Vanessa y Patricia, esas gravereras que han hecho que el día a día sea más llevadero tanto dentro como fuera del laboratorio, así como al Dr. Mario Perianes por su paciencia y horas que ha ejercido como informático particular haciendo que esta Tesis no se quedara colgada, gracias por vuestra amistad, saber ser y saber estar en todos los frentes. Nombrar también a Ruth, Ana, Dani, Hector,....

Mostrar un agradecimiento más específico a mis amigos que han seguido los pasos de este trabajo desde cerca, escuchando en más de una ocasión mis quejas, alegrías y satisfacciones, o entusiastas explicaciones sobre el desarrollo del oído interno del pollo, y que sin llegar a comprender muy bien las cosas que les contaba siempre me han dado su apoyo y ánimo para seguir hacia delante.

Por último, agradecer con especial hincapié a mis padres, hermano y cuñada por su cariño, respaldo y por saber darme las fuerzas necesarias en cada momento, sin su entrega no habría llegado hasta aquí. Mencionar a Aitana porque desde el día que nazca, será fuente de inspiración para abordar nuevos desafíos.

Gracias a todos.

A mis padres

A Juanjo e Inma

A Aitana

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1. Sistema vestibular.....	5
2. Sistema auditivo.....	8
3. Elementos no sensoriales.....	9
4. Desarrollo embrionario del oído interno	10
4.1. Placodas craneales.....	10
4.2. Inducción del esbozo ótico	12
4.3. Invaginación de la placoda ótica	13
4.4. Morfogénesis	14
4.5 Muerte celular y proliferación celular durante el desarrollo embrionario del oído interno.....	16
4.6 . Neurogénesis en el desarrollo embrionario del oído interno.....	19
CAPÍTULO 1. PATRONES DE EXPRESIÓN DURANTE EL DESARROLLO DEL OÍDO INTERNO DE AVES	23
INTRODUCCIÓN	25
1. Aspectos generales del oído interno de los Cordados.....	27
2. Especificación del epitelio ótico: teoría de los compartimentos limitados de restricción clonal	27
3. Especificación de los elementos sensoriales y no sensoriales durante el desarrollo del epitelio ótico	30
4. Factores de transcripción y moléculas de señalización para el correcto desarrollo del oído interno	32
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1. Material de estudio	41
2. Preparación del material	41
2.1. Fijación.....	41
2.2. Congelación.....	41
2.3. Microtomía.....	42
3. Síntesis de sonda a partir de plásmidos lineales	42
4. Hibridación <i>in situ</i> sobre secciones de criostato	45
5. Inmunohistoquímica.....	47

RESULTADOS	49
1. Expresión de los genes <i>Meis2/Raldh3/Otx2/Fgf10</i> en el estadio de vesícula ótica (HH18-20)	51
1.1. Porción dorso-lateral de la vesícula ótica.....	51
1.2. Porción dorso-medial de la vesícula ótica	51
1.3. Porción ventro-lateral de la vesícula ótica	52
1.4. Porción ventro-medial de la vesícula ótica.....	52
1.5. Regionalización del epitelio de la vesícula ótica	53
2. Expresión de los genes <i>Meis2/Raldh3/Otx2/Fgf10</i> en el estadio HH24	56
3. Expresión de los genes <i>Meis2/Raldh3/Otx2/Fgf10</i> en el estadio HH27	59
4. Expresión de los genes <i>Meis2/Raldh3/Otx2/Fgf10</i> en el estadio HH34	62
5. Estudio detallado de la expresión de <i>Fgf10</i>	64
5.1. Patrón de expresión de <i>Fgf10</i> en el estadio tardío de vesícula ótica	64
5.2. Patrón de expresión de <i>Fgf10</i> en estadio HH24	67
5.3. Expresión de <i>Fgf10</i> y especificación de los órganos sensoriales en el estadio HH25-26	71
5.4. Expresión de <i>Fgf10</i> en estadio HH27	74
5.5. Expresión de <i>Fgf10</i> en el estadio HH34	77
DISCUSIÓN	79
1. Regionalización del epitelio ótico	81
2. Un nuevo planteamiento sobre los compartimentos de epitelio ótico.....	84
3. Especificación de los elementos sensoriales: la expresión del gen <i>Fgf10</i>	86
4. Aspectos moleculares y evolutivos del oído interno de vertebrados	87
CONCLUSIONES	91
CAPÍTULO 2. MAPA DE DESTINO DE LA PLACODA ÓTICA DE AVES	95
INTRODUCCIÓN	97
1. Mapas de destino en estadios previos a la formación de la placoda ótica	99
2. Mapa de destino en los estadios de placoda y vesícula ótica.....	100
1.1. Mapa de destino en Rana (<i>Xenopus</i>)	100
1.2. Mapa de destino en aves (<i>Gallus gallus</i>).....	101
1.3. Mapa de destino en ratón (<i>Mus musculus</i>).....	102
3. Estudios de linaje celular	102
4. Consideraciones generales sobre los mapas de destino	103

OBJETIVOS	105
MATERIALES Y MÉTODOS.....	109
1. Trasplantes	111
2. Material necesario para las operaciones	111
3. Incubación de los huevos.....	112
4. Preparación de los huevos para trasplantar	112
5. Regiones trasplantadas	113
6. Detección del territorio transplantado en el embrión quimera.....	115
7. Inyecciones de DiI.....	117
RESULTADOS	119
1. Extensión de la placoda ótica en un embrión de estadio HH10	121
2. Mapa de destino del ectodermo cefálico enfrentado al rombómero 4 (r4)	121
3. Mapa de destino del ectodermo enfrentado al rombómero 5 (r5)	124
4. Mapa de destino del ectodermo enfrentado al pro-rombómero C.....	127
4.1. Mapa de destino del ectodermo enfrentado al rombómero 6 (r6)	127
4.2. Mapa de destino del ectodermo enfrentado al rombómero 7 (r7)	130
5. Resumen de los trasplantes realizados	132
6. Mapa de destino de la mitad dorso-ventral y la mitad rostro-caudal de la placoda ótica.....	134
7. Agrupaciones transversales y longitudinales de los trasplantes realizados en la placoda ótica.....	137
8. Inyecciones de DiI.....	140
DISCUSIÓN	143
1. Origen del desarrollo del sistema endolinfático.....	145
2. Origen de todas las máculas y la papilla basilar.....	145
3. Origen de las crestas y los canales semicirculares	147
4. Restricción de la migración celular en el desarrollo del oído interno.....	147
5. Conclusiones remarcables.....	149
CONCLUSIONES	151
CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES AFERENTES DURANTE EL DESARROLLO DEL OÍDO INTERNO DE AVES	155
INTRODUCCIÓN	157
1. Origen y diferenciación de los neuroblastos.....	160

2. Origen y proyección de los neuroblastos: dos posibles hipótesis alternativas	162
3. Mecanismos de guía axonal en el desarrollo del oído interno	163
OBJETIVOS	167
MATERIALES Y MÉTODOS	171
1. Detección del trasplante	174
2. Marcaje de neuroblastos	176
RESULTADOS	177
1. Patrón de expresión de <i>Fgf19</i> en estadios tempranos del desarrollo del oído interno	179
2. Neurogénesis en el estadio HH18-20	182
3. Diferenciación de los neuroblastos en el estadio HH24.....	184
4. Diferenciación de los neuroblastos en el estadio HH27.....	188
5. Correlación entre el origen de los neuroblastos y sus proyecciones al epitelio ótico	190
6. Trasplante del territorio presuntivo de las crestas.....	191
7. Trasplante del territorio presuntivo de la mácula del utrículo	193
8. Trasplante del territorio de la mácula del sáculo y un poco de la papila basilar proximal	195
9. Trasplante del territorio de la papila basilar distal y la mácula de la lagena	197
10. Trasplante del territorio de la papila basilar, mácula de la lagena y cresta posterior	198
DISCUSIÓN	201
1. Inervación de los elementos sensoriales: una posible relación directa entre origen y destino	203
2. Modelo de la distribución de las proyecciones aferentes	206
3. Mecanismos de guía axonal: perspectivas de futuro	207
4. Investigaciones en el desarrollo del GAV y la inervación de las células ciliadas: posibles avances en terapia celular	208
CONCLUSIONES	211
BIBLIOGRAFÍA	215

ABREVIATURAS

ant. , anterior	ml , mácula de la lagena;
AR , ácido retinoico;	mn , mácula neglecta;
bh , bolsa horizontal;	ms , mácula de sáculo;
bv , bolsa vertical;	MSP , mesodermo paraxial;
ca , cresta anterior;	mu , mácula de utrículo;
cc , conducto coclear;	NT , notocorda;
ccm , cruz común;	OT , otocisto;
ce , conducto endolinfático;	pb , papila basilar;
cl , cresta lateral;	pf , placa de fusión;
cn , cresta neural;	PN , placa neural;
CO , copa ótica;	PNR , región paraneural rostral;
cp , cresta posterior;	PNC , región paraneural caudal;
cs , conductos semicirculares;	PO , placoda ótica;
csa , canal semicircular anterior;	po , poro ótico;
csl , canal semicircular lateral;	post. , posterior;
csp , canal semicircular posterior;	R , rombencéfalo;
cus , conducto utrículo-sacular;	r , rombómero;
EF , epitelio faríngeo;	RC , pro-rombómero C;
ENNE , ect. no neural extraembrionario;	s , sáculo;
ep-ot , epitelio ótico;	se , saco endolinfático;
ect , ectodermo;	Td , tercio dorsal;
GA , ganglio acústico;	Ti , tercio intermedio;
GAV , ganglio acústico-vestibular;	TN , tubo neural;
GV , ganglio vestibular;	Tv , tercio ventral;
LB , lámina basal;	tv , <i>tegmentum vasculosum</i> ;
lp , línea primitiva;	u , utrículo;
M , mesénquima;	VO , vesícula ótica.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El oído interno es un complejo elemento sensorial formado por cavidades y conductos, por los cuales discurre la endolinfa. El epitelio que define al oído interno constituye el laberinto membranoso. Según su morfología y función, el oído interno se divide en dos sistemas: el vestibular y el auditivo.

1. Sistema vestibular

El sistema vestibular tiene funciones sensitivas que contribuyen a la percepción del propio movimiento, la posición de la cabeza y la orientación espacial en relación con la gravedad. También cumple funciones motoras importantes, ayudando a estabilizar la mirada, la cabeza y la postura.

El sistema vestibular está constituido por dos cavidades, el sáculo (s) y el utrículo (u), y tres canales semicirculares. El utrículo y el sáculo son dos grandes cámaras, conectadas entre sí por el conducto utrículo-sacular (cus). Los canales o conductos semicirculares son estructuras tubulares dispuestas en las tres direcciones del espacio, denominadas, atendiendo a su posición: canal semicircular anterior (csa), canal semicircular lateral (csl) y canal semicircular posterior (csp). Los canales semicirculares se abren al vestíbulo a través de cinco orificios, uno de los cuales es compartido por los conductos semicirculares anterior y posterior, en la rama común o *crus commune* (ccm). Del vestíbulo emerge un conducto que se extiende dorso-medialmente formando el conducto endolinfático (ce), el cual presenta en su porción distal una pequeña dilatación, el saco endolinfático (se) (Fig. 1).

En la porción vestibular del laberinto membranoso hay diferentes estructuras sensoriales. Asociada a cada canal semicircular encontramos las crestas (cresta anterior/superior, ca; cresta lateral, cl; cresta posterior, cp), encargadas de detectar la aceleración angular o rotacional de la cabeza. En las cámaras del utrículo y el sáculo se encuentran la mácula del utrículo (mu) y la mácula del sáculo (ms), respectivamente, que detectan la aceleración lineal y la gravedad (Fig. 1).

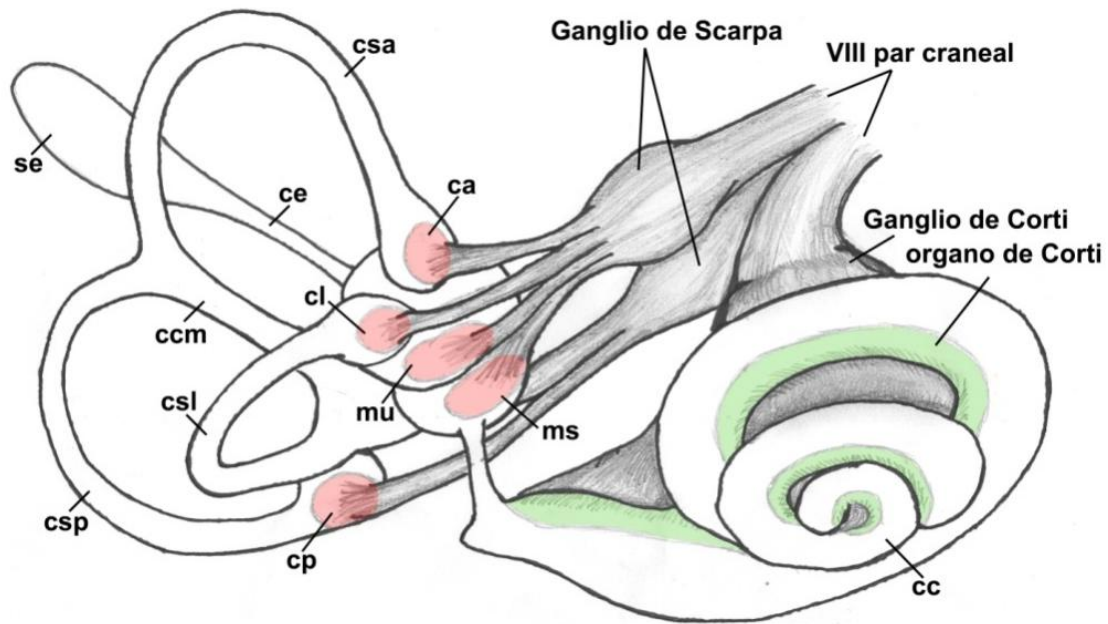


Figura 1.- Esquema de la distribución espacial de los diferentes componentes del oído interno de humanos. Se muestran los seis órganos sensoriales: (1) tres crestas (la cresta anterior/superior: ca; cresta lateral/horizontal: cl; cresta posterior: cp), ubicadas en sus correspondientes ampollas; (2) dos máculas (la mácula del sáculo: ms; la mácula del utrículo: mu), localizadas en el sáculo (s) y el utrículo (u); (3) y el órgano de Corti, confinado en la cóclea. Además, se observan órganos no sensoriales como: los canales semicirculares (anterior/superior: csa; lateral/horizontal: csl; posterior: csp; cruz común: ccm) y el sistema endolinfático (conducto endolinfático: ce; saco endolinfático: se). Las neuronas del ganglio vestibular (ganglio de Scarpa) y el ganglio acústico (ganglio de Corti) inervan a los elementos vestibulares y auditivos, respectivamente. Adaptado de Purves *et al.* (2007).

Estos órganos sensoriales tienen un neuroepitelio en el que se localizan las células ciliadas (sensoriales), mecanoreceptores específicos, y células de soporte (Fig. 2A). Las células ciliadas traducen el movimiento físico en impulsos nerviosos, transformando la energía cinética (y vibratoria, en el caso de la cóclea) en señales eléctricas. Las células ciliadas están inervadas por fibras aferentes de las neuronas ganglionares provenientes del propio neuroepitelio ótico, las cuales transmiten información sensorial desde las células ciliadas hasta los núcleos sensitivos cocleares y vestibulares en el rombencéfalo. A su vez, también están inervadas por una población de neuronas eferentes del rombencéfalo, que proporcionan la entrada de información a las células ciliadas (Köppl, 2001). Además, en el neuroepitelio encontramos células de soporte o sostén (Fig. 2A).

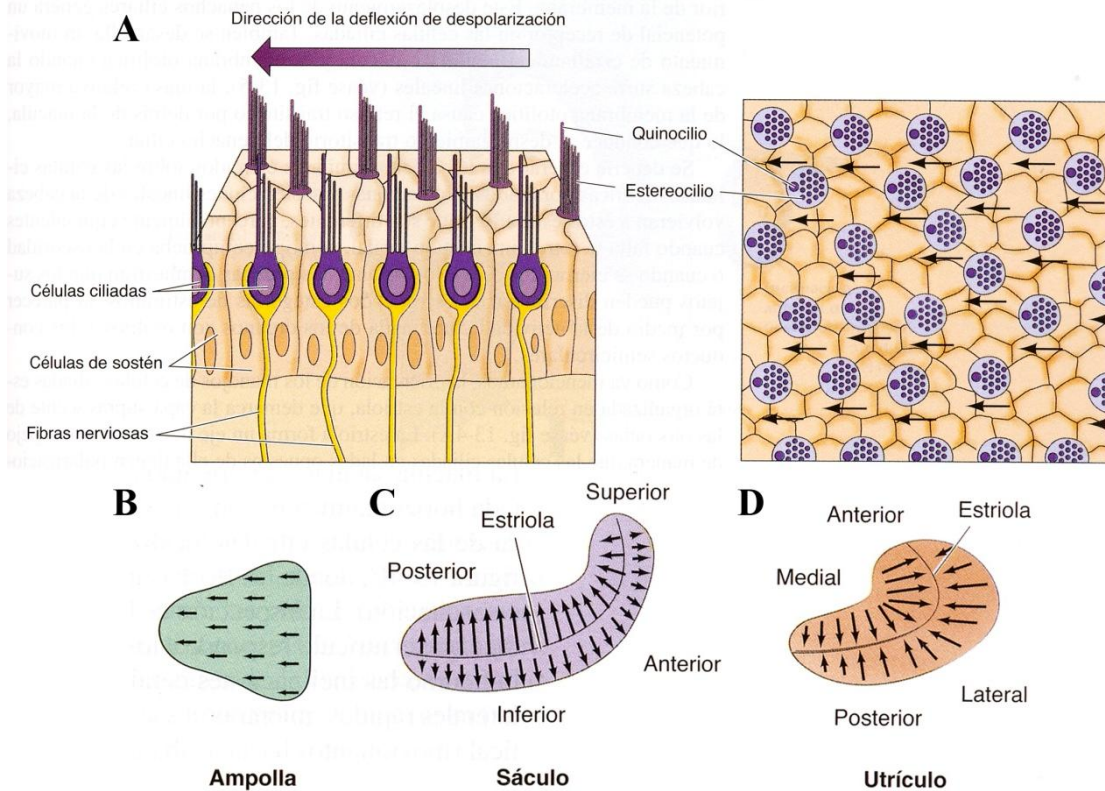


Figura 2. (A) Estructura y polarización morfológica del mancho ciliar de las células ciliadas vestibulares. (B) En las ampollas, situadas en la base de cada conducto semicircular, los penachos ciliares están orientados en la misma dirección. (C y D) En el sáculo y el utrículo, la estriola divide las células ciliadas en poblaciones con polaridades opuestas de los penachos ciliares. Tomada de Purves *et al.* (2007).

Las células sensoriales del utrículo y el sáculo se agrupan formando estructuras aplanadas que constituyen las máculas. Por el contrario, las células sensoriales asociadas a los conductos semicirculares se agrupan en elevaciones denominadas crestas, las cuales se encuentran en unas cámaras llamadas ampollas. Las células ciliadas en cada órgano vestibular presentan orientaciones específicas, ya que tienen que responder a los desplazamientos de la cabeza en todas las direcciones del espacio. En un canal semicircular, todas las células ciliadas de la ampolla están polarizadas en la misma dirección (Fig. 2B). Mientras que en el utrículo y el sáculo existe un área denominada estriola, que divide a las células ciliadas de dichas máculas en dos poblaciones con polaridades opuestas (Fig. 2C,D).



2. Sistema auditivo

El sistema auditivo transforma las ondas sonoras en distintos patrones de actividad neuronal. Dicho sistema se dispone en el conducto coclear (cc). Este conducto emerge desde la cámara del sáculo, dirigiéndose rostro-medialmente para finalizar por debajo del cerebro posterior o rombencéfalo. En aves, el conducto coclear presenta una forma tubular rectilínea, mientras que en mamíferos dicho conducto es una hélice cónica (Fig. 1).

Desde su extremo basal hasta su extremo apical, la cóclea es una estructura flexible dividida en tres partes por el tabique coclear: la membrana basilar y la membrana de Reissner. A cada lado del tabique coclear hay dos cámaras, la rampa vestibular y la rampa timpánica, bañadas por la perilinfa. Ambas rampas se encuentran delimitando a la rampa media, por la cual discurre la endolinfa. Al final del tabique coclear hay un orificio, conocido como helicotrema, que une la rampa vestibular con la rampa timpánica (Fig. 3).

La membrana basilar vibra en respuesta al sonido. Von Békésy, 1960, postuló que cada punto sobre la membrana basilar tiene una frecuencia característica en la que vibra de modo más eficiente. El movimiento de la onda de propagación inicia la transducción sensitiva al desplazar las células ciliadas que se ubican en la parte superior de la membrana basilar. Los cilios de las células ciliadas están inmersos en la membrana tectoria, los cuales son desplazados por un movimiento de cizallamiento entre dicha membrana y la membrana basilar producido por la onda sonora. Existen dos tipos de células ciliadas en la cóclea, las células ciliadas externas e internas. Juntas comprenden las células sensoriales de la cóclea (Fig. 3).

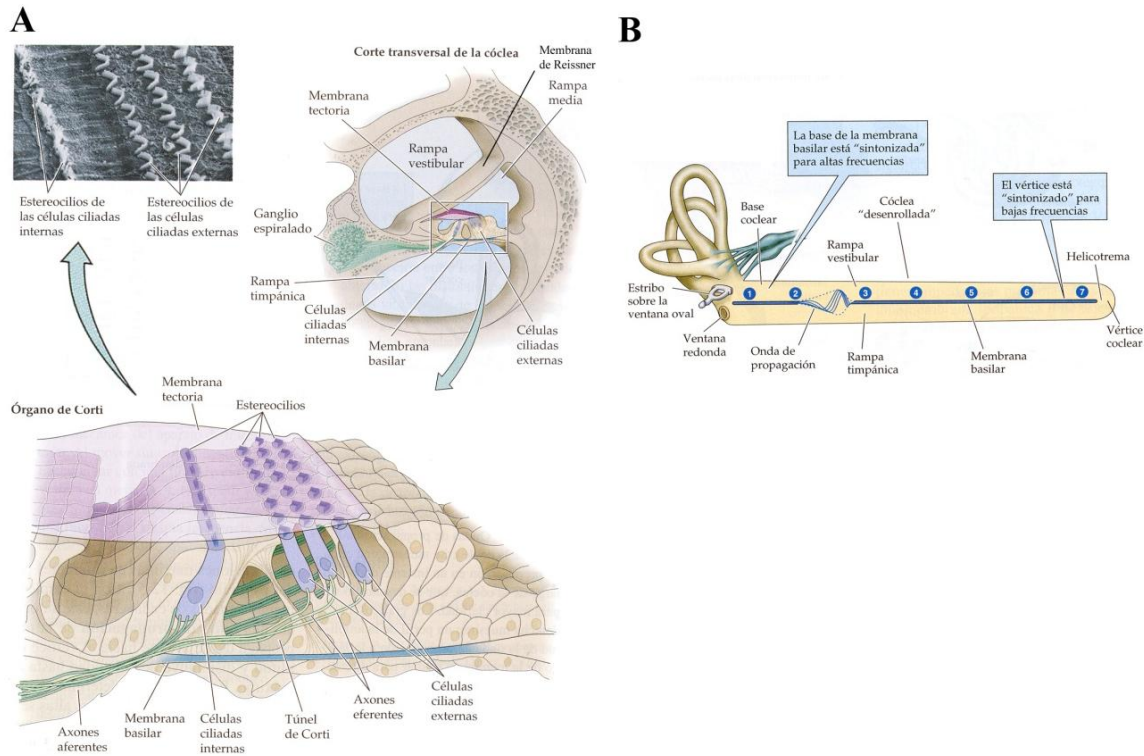


Figura 3. (A) Esquema de un corte transversal de la cóclea, el cual muestra la rampa media entre las rampas vestibulares y timpánica. La ampliación del órgano de Corti muestra que las células ciliadas se localizan entre la membrana basilar y tectoria; la última está transparente en el dibujo lineal. Imágenes tomada de Purves *et al.* (2007). (B) Ondas de propagación a lo largo de la cóclea. Se muestra una onda de propagación en un instante dado a lo largo de la cóclea. Dibujo tomado de Dallos (1992).

3. Elementos no sensoriales

En el oído interno, además de elementos sensoriales, también existen elementos no sensoriales. Entre ellos destacar: las cúpulas de las crestas ampulares (estructuras gelatinosas adosadas a las células ciliadas), las membranas otolíticas de las máculas (estructuras gelatinosas con otolitos, cristales de carbonato cálcico) y las membranas tectoria y basilar en la cóclea.

Por otra parte, el oído interno contiene otros tejidos implicados principalmente en la secreción, como son: (1) el epitelio simple cuboidal, que reviste los conductos semicirculares; (2) el conducto y saco endolinfático; y (3) el altamente vascularizado *tegmentum vasculosum* (en aves) o la estría vascular (en mamíferos), localizados en la pared lateral del conducto coclear (Fig. 1).



4. Desarrollo embrionario del oído interno

4.1. Placodas craneales

El esbozo ótico deriva de un engrosamiento del ectodermo cefálico, la denominada placoda ótica.

Las placodas craneales son regiones engrosadas de ectodermo cefálico que participan, durante el desarrollo embrionario de vertebrados, en la formación de determinados órganos de los sentidos (nariz, ojos, oídos y línea lateral) y las neuronas de los ganglios craneales sensoriales. En orden antero-posterior, las placodas craneales son: hipofisaria, olfatoria, del cristalino, del trigémino, ótica, línea lateral y epibranchial.

Estudios de mapa de destino en estadios de gástrula y neurulación temprana muestran que las placodas craneales se originan del ectodermo cefálico, justo en el borde de la placa neural/cresta neural y la futura epidermis. Así, todas las placodas craneales se originarían de una región común, y continua, la denominada región pre-placodal (Baker y Bronner-Fraser, 2001; Streit, 2004) (Fig. 4C). Este dominio pre-placodal continuo se subdividirán en dos: la región paraneural rostral (PNR) y la región paraneural caudal (PNC) (Fig. 4A,B).

Recientemente, se ha determinado un nuevo mapa de destino de la placa neural, territorio del ectodermo que dará lugar al sistema nervioso central. Esta placa neural tiene forma de “alas de mariposa”, situada justo en el extremo anterior de la línea primitiva (lp). De esta manera, se han conocido los límites del borde neural/no neural, lo que ha permitido localizar esa región pre-placodal (Fig. 4A-C; Fernández-Garre *et al.*, 2002; Rodríguez-Gallardo *et al.*, 2005). En la actualidad, se conoce la relación espacial entre patrones de expresión de determinados genes y el mapa de destino de la placa neural (Puelles *et al.*, 2005). Además, Groves y Bronner-Fraser (2000) han analizado la expresión de numerosos marcadores para redirigir estudios clásicos sobre la competencia y la especificación ótica en el desarrollo de aves. Similares estudios han sido abordados por Schlosser y Ahrens (2004), en el embrión de *Xenopus*, y por Torres y Giráldez (1998), en el oído de vertebrados.

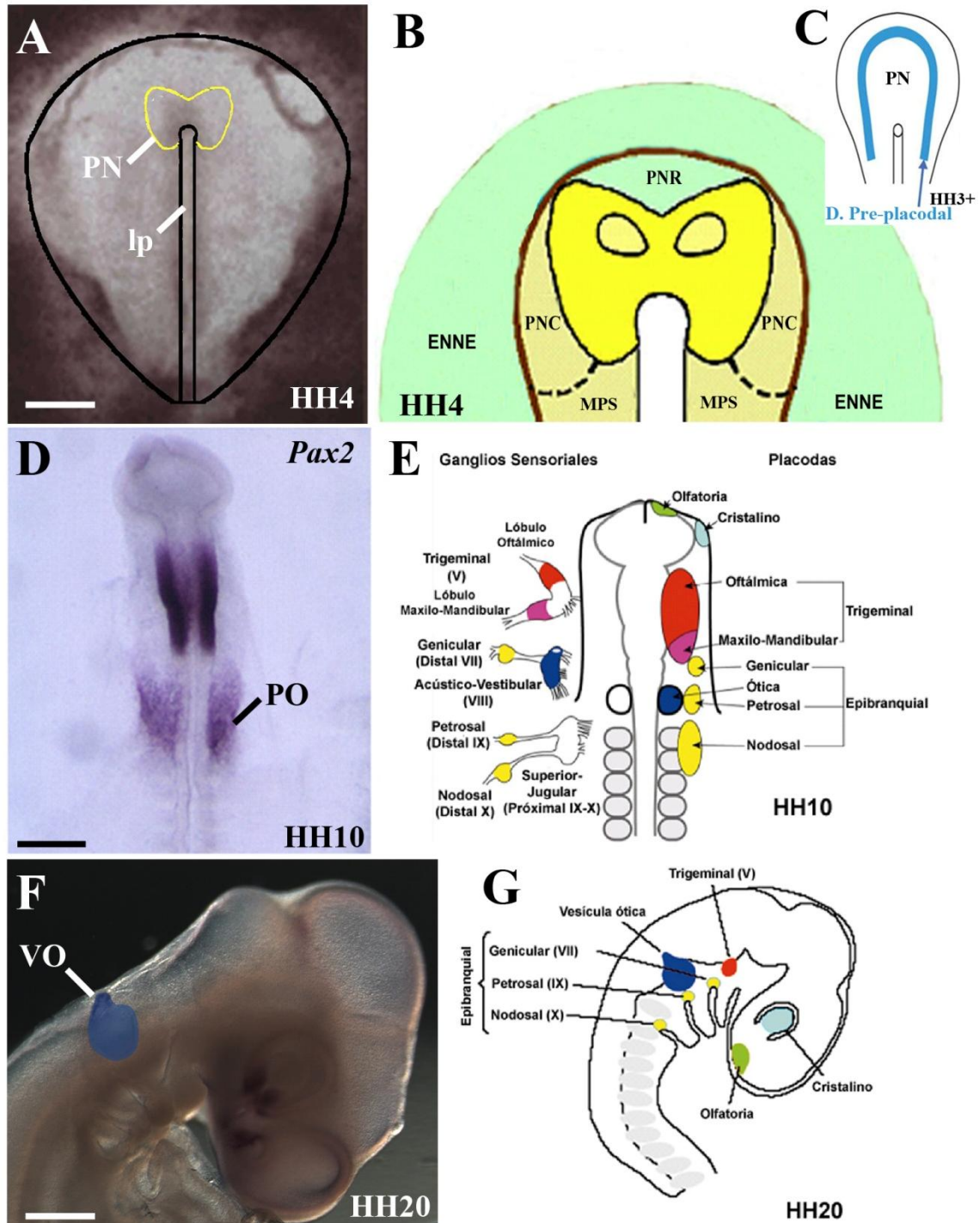


Figura 4.- (A) Visión dorsal del blastodermo de un embrión de pollo de estadio HH4 (Hamburger y Hamilton, 1951). La línea amarilla define la placa neural (PN) en el extremo de la línea primitiva (lp) (Fernández-Garre *et al.*, 2002). (B) Esquema de la porción anterior del embrión mostrado en A. Se representa, en amarillo, la placa neural. La región paraneural rostral (PNR) y la región paraneural caudal (PNC) se disponen justo adyacentes a la placa neural. La placoda ótica se originaría a partir de la PNC. (C) Esquema de un embrión de estadio HH4, donde se representa el dominio pre-placodal. (D) Hibridación *in situ* de un embrión de pollo de estadio HH10 (10 somitas) tratado con la sonda Pax2. La



placoda ótica (PO) está marcada en su totalidad por el gen *Pax2*. (E) Representación esquemática de la distribución de las placodas craneales en un embrión de aves de estadio HH10. (F) Localización de la vesícula ótica en un embrión de estadio HH20 (VO). (G) Representación esquemática de la distribución de los derivados de las placodas craneales en el embrión de estadio HH20. Adaptaciones de Puellas *et al.* (2005) (B), Ohyama (2007) (C), Baker y Bronner-Fraser (2001) (E) y Streit (2004) (G). La barra de aumentos en A indica 250µm, en D indica 370 µm, y en F indica 540 µm.

4.2. Inducción del esbozo ótico

Como ya se ha comentado, el esbozo ótico se desarrolla a partir de la placoda ótica. La adquisición de la competencia del primordio placodal es probablemente el primer paso en el desarrollo del oído interno y comienza en el estadio de gástrula temprana (Ohyama *et al.*, 2007). El siguiente paso es la especificación del campo ótico, restringiendo la región ótica. El tejido pre-placodal primero se especifica y después se compromete a su destino ótico por señales inductivas procedentes del neuroectodermo adyacente y el mesodermo subyacente (Groves y Bronner-Fraser, 2000; Baker y Bronner-Fraser, 2001; Ladher *et al.*, 2005; Schimmang, 2007). Experimentos con trasplantes, junto con evidencias moleculares y morfológicas, sugieren que la competencia del ectodermo para formar la placoda ótica sucede en una extensa región a lo largo de la placa neural/borde epidérmico durante la gastrulación y la neurulación temprana (Streit, 2002).

Los miembros familia de los FGFs (*Fibroblastic growth factor*) son considerados señales claves en diferentes estadios del desarrollo para el oído interno, siendo requeridos para la inducción de la placoda ótica, formación de la vesícula ótica y su posterior morfogénesis y diferenciación celular, conduciendo a la formación del oído interno adulto. Se ha demostrado que algunos de los miembros de la familia FGF son los primeros genes que actúan en la inducción del oído interno de pollo, en concreto FGF8 y FGF19, cuyos dominios de expresión se localizan en el endodermo y mesodermo, respectivamente. Se ha mostrado que *Fgf8* puede inducir la expresión de *Fgf19* en el mesodermo en estadio HH5 (Ladher *et al.*, 2005). La expresión de *Fgf8* en el endodermo es suficiente y necesaria para la expresión de *Fgf19* en el mesodermo, sugiriendo que *Fgf8* actúa en la inducción ótica vía *Fgf19* (Schimmang *et al.*, 2007). Por el contrario, *Fgf19* no es capaz de inducir marcadores óticos por sí solo (Ladher *et al.*, 2000; Martín y Groves, 2006). Sin embargo, *Fgf3*, que está presente en el mesodermo y

tubo neural durante la inducción ótica y es inducido por el gen *Fgf19*, es capaz de inducir marcadores óticos (Ladher *et al.*, 2000; Kil *et al.*, 2005). Por otro lado, *Wnt8c* se expresa en el neuroectodermo, solapándose con *Fgf19*. *Wnt8c* puede inducir la expresión de *Fgf3*, así como una débil expresión de marcadores óticos (Ladher *et al.*, 2000).

Por lo tanto, se podría decir entonces que la expresión del gen *Fgf8* induce la expresión de *Fgf19* en el mesodermo. La acción sinérgica entre el gen *Fgf19* y el gen *Wnt8c* proveniente del neuroectodermo induce la expresión del gen *Fgf3* en el mesodermo y rombencéfalo, el cual es suficiente para inducir la expresión de distintos marcadores óticos (Ladher *et al.*, 2000, 2005; Kil *et al.*, 2005; Martín y Groves, 2006; revisado por Schimmang, 2007).

Recientes estudios en ratón han demostrado que *Wnt8a* (análogo de *Wnt8c* en pollo), no es esencial durante la inducción y especificación ótica. Vendrell y colaboradores (2012) han mostrado que la expresión de *Wnt8a* depende de la presencia de *Fgf3*, sugiriendo que existe una regulación cronológica entre las señales de *Fgf* y *Wnt* durante la inducción y la especificación de la placoda ótica. *Wnt8a* por sí mismo no es necesario para la especificación de la placoda ni requerido junto con los *Fgfs* para la formación de la placoda y vesícula ótica. Sin embargo, *Wnt8a* y *Fgf3* son requeridos para la expresión de *Fgf15* (análogo al *Fgf19* de pollo) en el rombencéfalo, indicando una interacción recíproca entre las señales de *Fgf* y *Wnt*. Por otro lado, la inhibición de *Wnt8a* revela un requerimiento de dicho gen en la porción dorsal de la vesícula ótica durante la morfogénesis. Por consiguiente, los *Fgfs* son requeridos para la inducción ótica, mientras que los genes *Wnts* promueven la especificación y la regionalización del epitelio ótico (Vendrell *et al.*, 2012).

4.3. Invaginación de la placoda ótica

La placoda ótica corresponde con un engrosamiento del ectodermo cefálico situada a ambos lados del rombencéfalo (cerebro posterior) (Fig. 5A,B,E,F). La extensión exacta de dicha placoda ótica no se conoce muy bien, aunque parece estar localizada entre la mitad posterior del rombómero 4 y el rombómero 6 en el embrión de 10 somitas (Knowlton, 1967; Vaage, 1969; Álvarez, 1988; Álvarez *et al.*, 1989; Álvarez y Navascués, 1990; Álvarez *et al.*, 2003).



Desde los primeros momentos de su *formación*, la placoda ótica se presenta ligeramente invaginada y hundida en la cabeza del embrión, dando lugar a la llamada copa ótica (CO; Fig. 5C,G). Durante el proceso de invaginación, los bordes de la copa ótica se elevan dorsalmente (estadio de 20 somitas) y se acercan entre sí (estadio de 25 somitas). En estos momentos del desarrollo, se observa el poro ótico o fosita ótica. Durante este proceso, la porción más dorso-medial del epitelio ótico queda en estrecho contacto con el tubo neural, mientras que la porción más ventral mantiene su interacción con el mesénquima embrionario subyacente, así como por una mayor proximidad con la notocorda (NT) y el epitelio faríngeo (EF) (Álvarez y Navascués, 1990; Fig. 5G). Cuando los bordes de la copa ótica contactan, el esbozo ótico se separa del ectodermo cefálico del que se originó, dando lugar a una estructura casi esférica que se denomina otocisto o vesícula ótica (VO; estadio de 26-28 somitas; O'Rahilly, 1963; Knowlton, 1967; Álvarez y Navascués, 1990) (Fig. 5D,H).

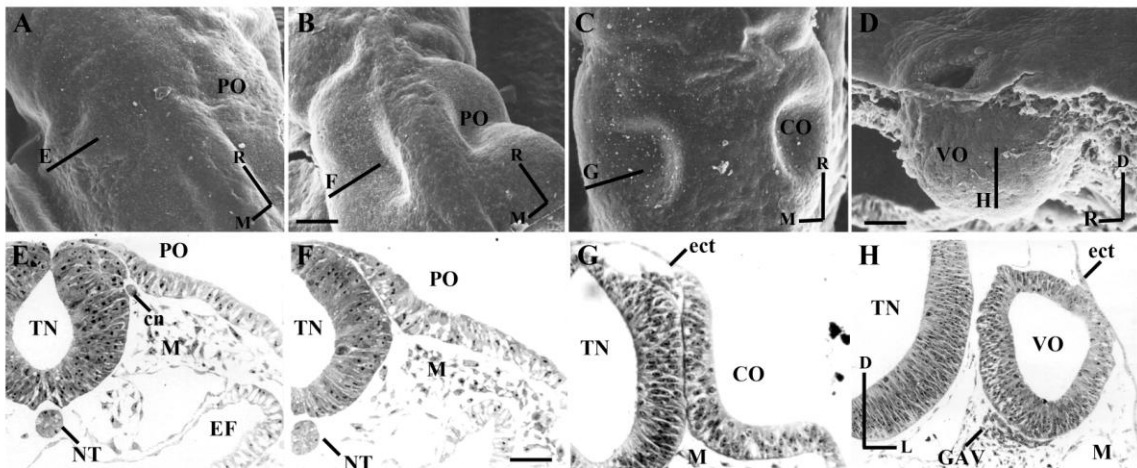


Figura 5.- Imágenes de microscopía electrónica de barrido (A-D) y de secciones semifinas (E-H) de las primeras etapas del desarrollo embrionario del oído interno de aves: (A, E) placoda ótica (PO); (B, F) inicio de la invaginación de la placoda ótica (PO); (C, G) copa ótica (CO); (D, H) vesícula ótica (VO). Las líneas en A-D indican los planos de cortes mostrados en E-H. Obsérvese la localización de las crestas neurales (cn en E). Orientación: D, dorsal; L, lateral; M: medial; R: rostral. Tomadas de Álvarez y Navascués (1990) (A-D) y Álvarez (1988) (E-H). La barra de aumentos en B indica 150 μ m (aplicado a A-C), en D indica 92 μ m, y en F indica 45 μ m (aplicado a E-H).

4.4. Morfogénesis

La vesícula ótica sufre importantes cambios morfogénéticos que conducen a la formación del oído interno adulto. Los mecanismos moleculares y celulares responsables de esta transformación son similares a los observados en la formación de

otras estructuras embrionarias huecas que derivan de un epitelio embrionario (ectodermo o endodermo), por ejemplo, el tubo neural, la vesícula del cristalino, el sistema olfativo, el esbozo del tiroides, etc. Entre estos cambios, hay que considerar los procesos de proliferación y muerte celular, remodelación celular mediada por el citoesqueleto, interacciones célula a célula, adhesión celular y una estrecha relación con la matriz extracelular, entre otros. Estos eventos son responsables de un crecimiento diferencial que conduce a la creación de las diferentes cavidades en las que está subdividida el oído interno en el adulto (Purves *et al.*, 2007)

A partir del tercer o cuarto día de incubación del embrión de aves (estadios HH18 y 24; E3-4), el esbozo ótico aparece claramente dividido en dos protuberancias o partes: dorsal (*pars superior*) y ventral (*pars inferior*) (Fig. 6).

La protuberancia dorsal (*pars superior*) dará lugar a los tres canales semicirculares, que se originan a partir de dos expansiones o bolsas, la bolsa vertical (bv) y la bolsa horizontal (bh), ambas situadas en la porción dorso-lateral del esbozo ótico (Fig. 6C). La bolsa vertical dará lugar al canal semicircular anterior y posterior, con una porción común, la cruz común (ccm). La bolsa horizontal dará lugar al canal semicircular horizontal (Fig. 6D). Este desarrollo justifica el hecho de que las alteraciones de los canales semicirculares anterior y posterior suelen estar asociadas, y normalmente independiente de las alteraciones asociadas al canal semicircular lateral (Jackler *et al.*, 1987). Las tres ampollas, que alojan a las tres crestas, se desarrollaran como expansiones de dichos tubos en la cercanía del vestíbulo. Mecanismos de muerte celular programada o de transdiferenciación celular estarían implicados en la morfogénesis de estos canales (Waterman y Bell, 1984; Martín y Swanson, 1993; Fekete *et al.*, 1997; Nishikori *et al.*, 1999; Fig. 6).

De la cara medial de la protuberancia dorsal emerge el sistema endolinfático. El utrículo (u), con su correspondiente mácula (mu), se origina como una expansión de la protuberancia dorsal, justo en su porción más ventral, cercana a la protuberancia ventral (Fig. 6B,C). En aves, existe otro elemento sensorial vestibular dorsal, denominado mácula neglecta (mn), observado solo en algunos mamífero. Este elemento sensorial se ubicada en la parte posterior del oído interno, en una pequeña expansión cercana a la ampolla posterior.



La protuberancia ventral (*pars inferior*) dará lugar al sáculo (s), situado siempre cerca del utrículo, y al conducto coclear (cc; Fig. 6). De su cara antero-medial emerge el esbozo del sáculo (s; mácula del sáculo, ms), mientras que el conducto coclear surge en estrecha relación con el sáculo (Fig. 6B-D). En el conducto coclear (cc) se dispone el órgano de Corti, o papila basilar (pb) en vertebrados no mamíferos, el cual se desarrollará en la pared medial de dicho conducto coclear (Fig. 6B-D). La mácula de la lagena (ml), ausente en mamíferos, se localiza en la parte más distal del conducto coclear (Bissonnette y Fekete, 1997; Fig. 6B-D). La estría vascularis en mamíferos, o *tegmentum vasculosum* (tv) en aves, se dispone en la pared lateral del conducto coclear en desarrollo (Fig. 6D).

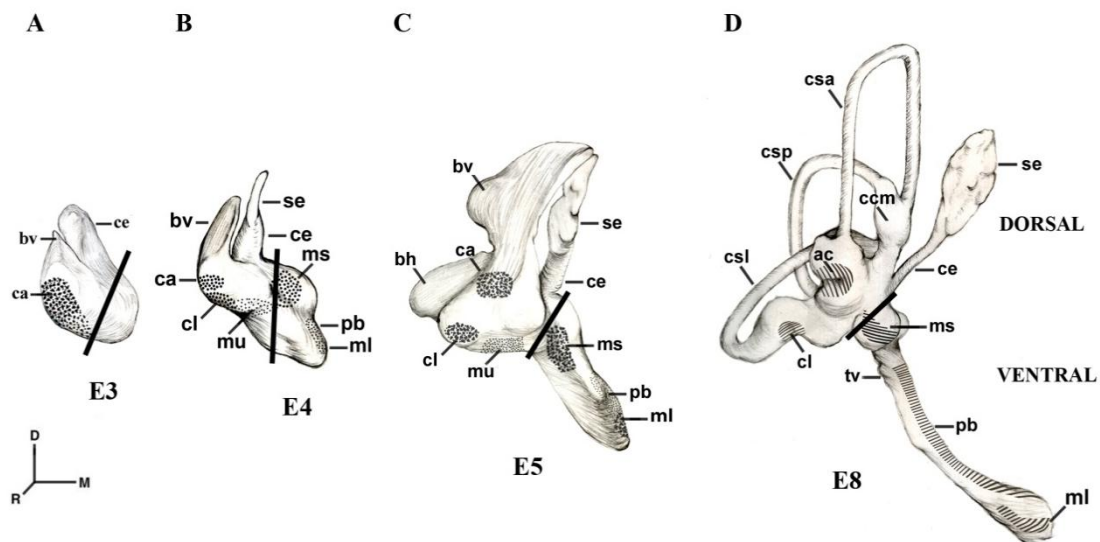


Figura 6. (A-D) Esquemas de una visión anterior, representando los cambios morfogénéticos del oído interno de aves de tres días (E3, A), cuatro días (E4, B), cinco días (E5, C) y ocho días de incubación (E8, D). La línea a través del esbozo ótico separa la protuberancia dorsal de la ventral (*pars superior/pars inferior*). Se observan claramente los distintos elementos sensoriales y no sensoriales que se diferencian en estas dos regiones. Orientación: D: dorsal; M, medial; R: rostral. Tomadas de Sánchez-Guardado *et al.* (2012).

4.5 Muerte celular y proliferación celular durante el desarrollo embrionario del oído interno

Durante el desarrollo del oído interno, la muerte celular programada o apoptosis es un proceso fisiológico de autodestrucción celular controlada, la cual permite: (i) la morfogénesis del laberinto membranoso; (ii) la correcta diferenciación de las células

ciliadas y las células de soporte; (iii) la renovación fisiológica del epitelio sensorial, y (iv) la correcta neurogénesis (Represa *et al.*, 1990; Fekete *et al.*, 1997; Zheng y Gao, 1997; Nishizaki *et al.*, 1998; Nishikori *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 2000; Nikolic *et al.*, 2000; Avallone *et al.*, 2002; León *et al.*, 2004).

Los primeros cuerpos apoptóticos, característicos de la muerte celular programada, aparecen en los bordes de la placoda ótica durante su proceso de invaginación (Fig. 7A; Álvarez y Navascués, 1990; Represa *et al.*, 1990, 1991; Nishikori *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 2000; Sánchez-Calderón, 2005). Este foco de muerte celular se mantiene durante el proceso de cierre del esbozo ótico y separación definitiva del ectodermo cefálico de origen (Fig. 7B). Poco tiempo después, una nueva región apoptótica aparece en la pared ventro-medial de la vesícula ótica, coincidiendo espacial y temporalmente con la delaminación de los neuroblastos para dar lugar al ganglio acústico-vestibular, en el cual también se detectan cuerpos apoptóticos (Represa *et al.*, 1990; León *et al.*, 2004).

En estadios más avanzados del desarrollo embrionario, la apoptosis ha sido detectada en la zona dorso-medial del epitelio ótico, en donde se origina el conducto endolinfático (Represa *et al.*, 1990; Fekete *et al.*, 1997; Nishikori *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 2002). El foco de muerte celular ventro-medial, asociado a la formación del ganglio acústico-vestibular, persiste durante la elongación del conducto coclear, situado inmediatamente proximal a la mácula del sáculo (Marovitz *et al.*, 1976; Fekete *et al.*, 1997; Nishikori *et al.*, 1999; Nikolic *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2002; Sánchez-Calderón, 2005).

Además, la muerte celular también está implicada en la formación de los canales semicirculares. Éstos se forman a partir de unas bolsas aplanadas (la bolsa horizontal y vertical). En cada una de ellas, las paredes se aproximan entre sí hasta contactar, dando lugar a la denominada placa de fusión (pf; Fig. 7C, D''). En estas regiones, las células epiteliales desaparecen para formar finalmente los canales semicirculares (Fig. 7D', D'', D'''). En pollo (Fekete *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 2002) y *Xenopus* (Haddon y Lewis, 1996), se detecta muerte celular en la zona de contacto. Sin embargo, no se ha detectado muerte celular en las placas de fusión en el pez cebra (Waterman y Bell, 1984), ni en embriones de ratón (Martín y Swanson, 1993) y de humanos (Nishikori *et al.*, 1999). Las diferencias descritas sugirieren que, además de la muerte celular, existen otros



mecanismos celulares, como la transdiferenciación celular, que puede también estar implicada en la formación de los canales semicirculares.

En la formación de los órganos sensoriales, también se observan regiones de muerte celular (Fig. 7C; ver Sánchez-Calderón, 2005). Se ha sugerido que esta muerte celular podría estar implicada en eliminar las células que no se especifican. Según Rubén (1967), en el oído interno se produce una sobreproducción de células que lo protegen durante el desarrollo de los posibles daños que pueda sufrir. En estadios más avanzados, su número se reduce mediante apoptosis a un valor funcionalmente correcto. Esta teoría está apoyada por los resultados obtenidos en ratón (Marovitz *et al.*, 1976; Anniko *et al.*, 1979; Nishizaki *et al.*, 1998) y pollo (Hemond y Morest, 1992; Fekete *et al.*, 1997). Por lo tanto, para la correcta morfogénesis del oído interno, es necesario un adecuado balance entre muerte celular y proliferación celular.

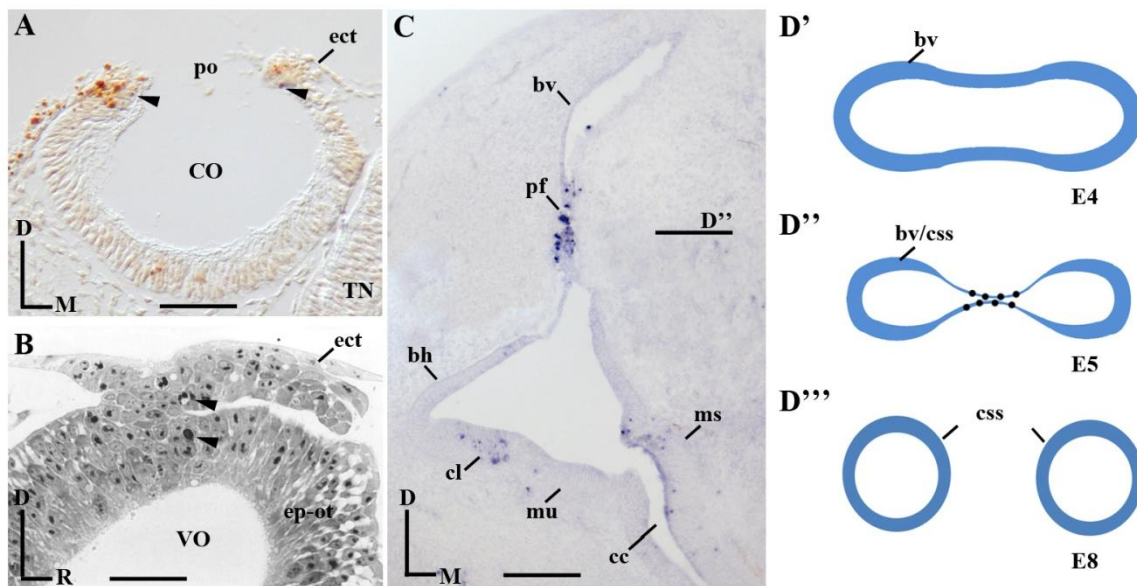


Figura 7. Muerte celular durante el desarrollo del oído interno. Se observan cuerpos apoptóticos (cabezas de flecha) en los bordes de la copa ótica (**A**; CO), en la zona de fusión de esos bordes en la formación de la vesícula ótica (**B**; VO) y en la placa de fusión durante la formación de los canales semicirculares (pf; **C**, **D''**), por ejemplo, el canal semicircular superior (css). (**D'**, **D''**, **D'''**) Etapas en la formación del canal semicircular superior (css) a partir de la bolsa vertical (bv). **D''**, indicada en **C**, muestra la placa de fusión con cuerpos apoptóticos (puntos en **D''**). Las secciones **A** y **C** fueron tratadas con la técnica TUNEL (detección de apoptosis o muerte celular programada). Se observa también muerte celular en algunos elementos sensoriales (**C**; cl, mu, ms). Orientación: D: dorsal; L: lateral; M: medial; R: rostral. Tomadas de Sánchez-Calderón *et al.* (2005) (**A**, **C**) y Álvarez, 1988 (**B**). La barra de aumentos en **A** indica 40 μ m, en **B** indica 30 μ m, y en **C** indica 65 μ m.

4.6 . Neurogénesis en el desarrollo embrionario del oído interno

La especificación de algunas células del epitelio ótico en neuroblastos es quizás la decisión más temprana del destino celular que tiene lugar en el desarrollo del oído interno (Fig. 8). Al mismo tiempo que ocurre la invaginación de la placoda ótica, una población de células del epitelio ótico se desprenderán de él, justo de la parte más ventro-medial de la copa ótica, atravesando la lámina basal del epitelio ótico y sin alterar la integridad del mismo. Estas células migratorias, que invaden el mesénquima subyacente, son precursoras de neuronas (neuroblastos) (Fig. 8; Álvarez *et al.*, 1989). Por lo tanto, la formación de las neuronas del ganglio acústico-vestibular (GAV) es un proceso secuencial que comprende: primero, la especificación de los precursores neuronales en el epitelio ótico a partir de un progenitor común epitelial multipotente; segundo, el desprendimiento y migración de los neuroblastos epiteliales hacia el mesénquima subyacente; y finalmente, la diferenciación de los neuroblastos en neuronas pseudopolares (Alsina *et al.*, 2004; Sánchez-Calderón *et al.*, 2007b).

Las neuronas del GAV y los elementos sensoriales surgirían a partir de un progenitor común epitelial multipotente, situado en un territorio del epitelio ótico que expresa los genes *Ngn1* y *Delta1*. En una segunda etapa, los neuroblastos, ya diferenciados, expresarían los genes *NeuroD* y *NeuroM*, presentando aun una baja actividad proliferativa. Después de este periodo de determinación celular, los neuroblastos empiezan a dividirse y abandonan el epitelio ótico. En este momento, estas células pueden ser consideradas neuroblastos ganglionares, expresando marcadores como *Islet1/2* y *Tuj1*, además de *NeuroD/M* (Alsina *et al.*, 2004).

La señalización mediada por los FGFs está implicada en estos eventos de especificación y determinación de los precursores neurales dentro del epitelio ótico (neuroblastos epiteliales) (Alsina *et al.*, 2004). La zona del epitelio ótico de la que se desprenden los primeros neuroblastos, los cuales expresan el gen *Fgf19* (Fig. 8A-C, D-G) (Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a), coincide con una estrecha franja situada en la zona de enfrentamiento del territorio de expresión de los genes *Fgf10* y *Otx2* (Fig. 8A-G; Pauley *et al.*, 2003; Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a). Además, Hidalgo-Sánchez y colaboradores sugirieron que los neuroblastos se originan desde un territorio rostro-medial entre los dominios de expresión de *Otx2* y *Gbx2*, un área que expresa parcialmente *Fgf8* (Hidalgo-Sánchez *et al.*, 2000). En el pez cebra, el mutante *ace*



(pérdida de la función *Fgf8*) presenta un GAV considerablemente reducido (Leger y Brand, 2002; Phillips *et al.*, 2001). Estas evidencias fueron confirmadas con estudios experimentales. Ensayos *in vivo* e *in vitro* en los que se implantaron bolas impregnadas de *Fgf2* y *Fgf8* llevaron a un aumento del tamaño del GAV, consecuencia de una mayor proliferación y migración de los neuroblastos (Adamska *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren claramente una estrecha relación entre los FGFs y la formación del GAV (Alsina *et al.*, 2004; Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a,b; Fantetti y Fekete, 2012). Otras moléculas de señalización, como el factor de crecimiento insulínico (IGF-1) (*Insulin-like Growth Factors*), podrían estar también implicados en este proceso de diferenciación neuronal (Camarero *et al.*, 2003; Sánchez-Calderón *et al.*, 2007b).

Estudios cuantitativos de la proliferación celular, la distribución espacio-temporal de las figuras mitóticas y la orientación del huso mitótico, todo ello asociado al proceso de migración de los neuroblastos, han mostrado que el índice mitótico aumenta significativamente en esta zona de migración (Álvarez *et al.*, 1989). Además, la frecuencia de las mitosis con su huso mitótico orientado radialmente es mayor en esta región que en el resto del epitelio ótico, lo cual podría facilitar el desprendimiento de los neuroblastos en migración. Hay que tener en cuenta que, aunque la mayoría de las divisiones mitóticas se dan en la cara apical del epitelio ótico, algunas figuras mitóticas se aprecian excepcionalmente en la región basal (Álvarez *et al.*, 1989). Estas evidencias sugieren que los neuroblastos migrando, aún dentro del epitelio ótico, sufrirían mitosis que aumentarían su número sustancialmente (Fig. 8H-L) (Álvarez *et al.*, 1989).

Una vez en el mesénquima cercano al esbozo ótico, los neuroblastos ganglionares, tras un largo proceso de diferenciación celular, darán lugar a neuronas pseudopolares que constituirán el GAV. Estas neuronas, durante su maduración, emitirán un axón que se bifurcará en “T” para inervar, por una parte, a cada uno de los elementos sensoriales que se diferenciarán en el laberinto membranoso ótico (Fekete y Campero, 2007), guiados por factores difusibles y atravesando la correspondiente porción de la lámina basal. Por otra parte, estas neuronas del GAV inervarán también a neuronas de determinados núcleos sensitivos de la vía auditiva o vestibular situados en el rombencéfalo o cerebro posterior (Ramón y Cajal, 1908a,b; Carney y Silver, 1983; Whitehead y Morest, 1985a,b). Según avanza el desarrollo embrionario, se produce la segregación del GAV. El ganglio vestibular o de Scarpa se sitúa en la porción más anterior y lateral, mientras que el ganglio coclear o espiral se dispondrá más

ventralmente (Ramón y Cajal, 1908a,b; Knowlton, 1967; Altman y Bayer, 1983; Carney y Silver, 1983).

El GAV está también constituido por células de Schwann y células satélite, las primeras de estas células siendo responsable de la mielinización de las fibras en dicho ganglio. Estas células gliales no proceden del epitelio ótico en desarrollo, tal y como lo hacen todos los neuroblastos, sino que proceden de las crestas neurales, las cuales se originan del borde del tubo neural durante su proceso de invaginación y cierre (cn; Fig. 5E), especialmente de regiones más anteriores al esbozo ótico en formación (D'Amico-Martel, 1982; D'Amico-Martel y Noden, 1983).

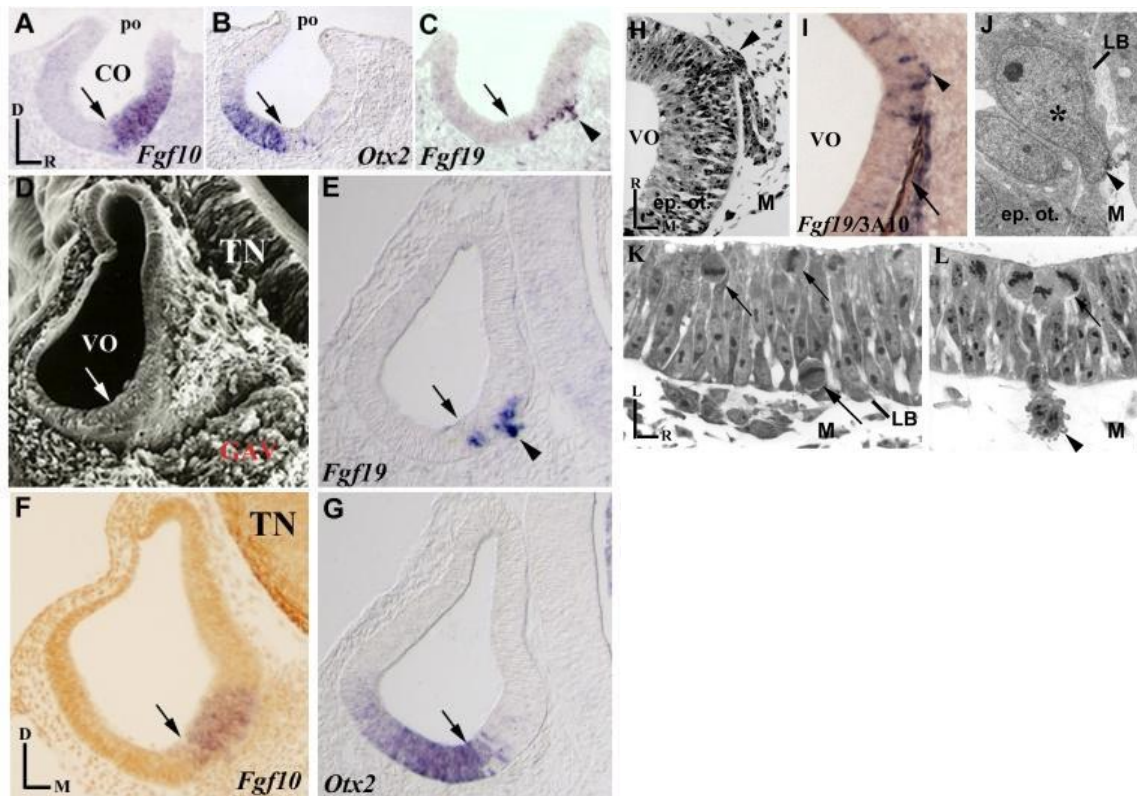


Figura 8. Migración de los neuroblastos en la formación del ganglio acústico-vestibular (GAV). (A-C) Secciones sagitales a la copa ótica (CO). (D) Microscopía electrónica de barrido y (E-G) secciones transversales a la vesícula ótica (VO). (H-L) Detalles de secciones semifinas horizontales (H, K, L), de una sección de criostato tratada con la sonda *Fgf19*/anticuerpo 3A10 (I) y de una sección de microscopía electrónica de transmisión (J). Los neuroblastos, marcados por la expresión del gen *Fgf19* (cabezas de flechas en C, E, I), se desprenden de una porción del epitelio ótico situada en la interfase entre los territorios de expresión de los genes *Fgf10* (flechas en A, F) y *Otx2* (flechas en B, G). (J, L) Detalle de la prolongación de un neuroblasto que está abandonando el epitelio ótico (ep.ot) a travessando la lámina basal (LB) (cabeza de flecha en H-J), o que ya está en el mesénquima subyacente (M) (cabeza de flecha en



L). (**K**) distribución de las figuras mitóticas (flechas) en la zona de migración de los neuroblastos, señalando especialmente las mitosis radiales (flecha grande en K). Orientación: D: dorsal; L: lateral; M: medial; R: rostral. Tomadas de Sánchez-Calderón *et al.* (2007) (**A-C, I**) y Álvarez y Navascués (1990) (**D**) y Álvarez *et al.* (1989) (**H, J, K, L**).

CAPÍTULO 1

PATRONES DE EXPRESIÓN DURANTE EL DESARROLLO DEL OÍDO INTERNO DE AVES

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales del oído interno de los Cordados

En vertebrados, el oído interno más simple, en cuanto a su morfología y número de elementos sensoriales, se encuentra en los *Mixines*, el cual presenta tres elementos sensoriales: una mácula (*macula communis*) y dos crestas (cresta anterior y posterior), éstas últimas asociadas a un único canal semicircular (Lewis *et al.*, 1985; Fritzsche *et al.*, 2002). Por otra parte, el oído interno más complejo, en cuanto a elementos sensoriales se refiere, está presente en ciertas especies de anfibios, que tiene nueve zonas sensoriales diferentes: tres crestas, mácula del utrículo, mácula del sáculo, mácula de la lagena, papila neglecta, papila basilar y *papilla amphibiorum* (esta última exclusiva de la Clase *Amphibia*) (Fritzsche *et al.*, 2002). Sin embargo, el oído interno más complejo, en cuanto a la morfología es el de mamíferos, ya que presenta cada elemento sensorial en una cámara casi independiente del resto y un conducto coclear enrollado sobre sí mismo.

Numerosos estudios descriptivos sobre la expresión de determinados factores de transcripción y otros estudios experimentales sugieren que el desarrollo de las diferentes estructuras del oído interno podría recapitular su historia evolutiva (Harrison, 1936; Léger y Brand, 2002; Raft *et al.*, 2004; Bok *et al.*, 2007; Whitfield y Hammond, 2007; Alsina *et al.*, 2009; Groves y Fekete, 2012). En términos generales, la evolución del oído interno se basa en la multiplicación y modificación de regiones sensoriales existentes, permitiendo la diversificación funcional debido a la exploración de nuevos ambientes (Fritzsche, 1998; Fritzsche *et al.*, 2002). De esta manera, la evolución ha conseguido transformar un oído simple, como el de *Mixines*, en una compleja estructura tridimensional con hasta nueve elementos sensoriales (Lewis *et al.*, 1987; Fritzsche, 1987; Fritzsche y Wake, 1988; Fritzsche *et al.*, 2002; Groves y Fekete, 2012).

2. Especificación del epitelio ótico: teoría de los compartimentos limitados de restricción clonal

Durante el desarrollo embrionario del oído interno de vertebrados, se requiere una correcta coordinación entre la morfogénesis del esbozo ótico y la especificación del destino celular en el propio epitelio ótico. La morfogénesis transforma un territorio epitelial plano (la placoda ótica) en una esfera hueca (el otocisto o vesícula ótica). Las células de la placoda ótica proliferan y se especifican en los diferentes tipos celulares



que constituyen el laberinto membranoso: las células ciliadas (mecanorreceptores sensoriales) y células de soporte de los distintos órganos sensoriales, las neuronas del ganglio acústico-vestibular y los tejidos no sensoriales, algunos de ellos de naturaleza secretora. Además de los mecanismos moleculares y celulares orientados a la especificación de los distintos tipos celulares, sería interesante conocer los procesos por los cuales estas células se disponen en una adecuada disposición espacio-temporal en esta estructura tridimensional tan compleja, sobre todo en relación con los ejes antero-posterior, dorso-ventral y latero-medial (Fig. 9A y B; Fekete, 1996).

La especificación en el epitelio ótico está controlada por la expresión asimétrica de determinados genes reguladores e interacciones celulares locales (Fekete, 1996; Whitfield *et al.*, 1997; Lang y Fekete, 2001; Bok *et al.*, 2007; Alsina *et al.*, 2009; Chatterjee *et al.*, 2010; Groves y Fekete, 2012). El establecimiento de compartimentos del epitelio ótico en las etapas iniciales del desarrollo del esbozo ótico podrían ser esenciales para una posible identificación regional y posterior especificación del destino celular dentro del epitelio ótico (Fig. 9C). Estos compartimentos corresponderían con dominios de linaje celular restringido, definidos por los límites de expresiones de genes reguladores (Fig. 9E). El borde común entre dos compartimentos se denomina límite de compartimentos (Dahmann y Basler, 1999). Por lo tanto, estas áreas creadas durante el desarrollo embrionario del oído interno podrían estar implicadas en dictar la posición de los distintos órganos sensoriales y no sensoriales en el adulto (Fig. 9D) (Brigande *et al.*, 2000b; Fekete y Wu, 2002). Este modelo de desarrollo, basado en el establecimiento de compartimentos y límites de expresión génica, fue propuesto por Meinhardt para explicar la diferenciación y regeneración durante el desarrollo de las alas de *Drosophila* y los miembros de vertebrados (Meinhardt, 1983a,b; revisado en Meinhardt, 2008). Este modelo es clave también en el desarrollo del tubo neural de vertebrados (Puelles *et al.*, 2007). Esta hipótesis plantea el enfrentamiento de poblaciones diferentes genéticamente. A lo largo del borde de dicho territorio, se induce la secreción de un morfógeno. La fuente de este morfógeno sería una línea si son dos los dominios en contacto, mientras que sería un punto si se da la intersección de dos o más límites (Meinhardt, 1983a,b).

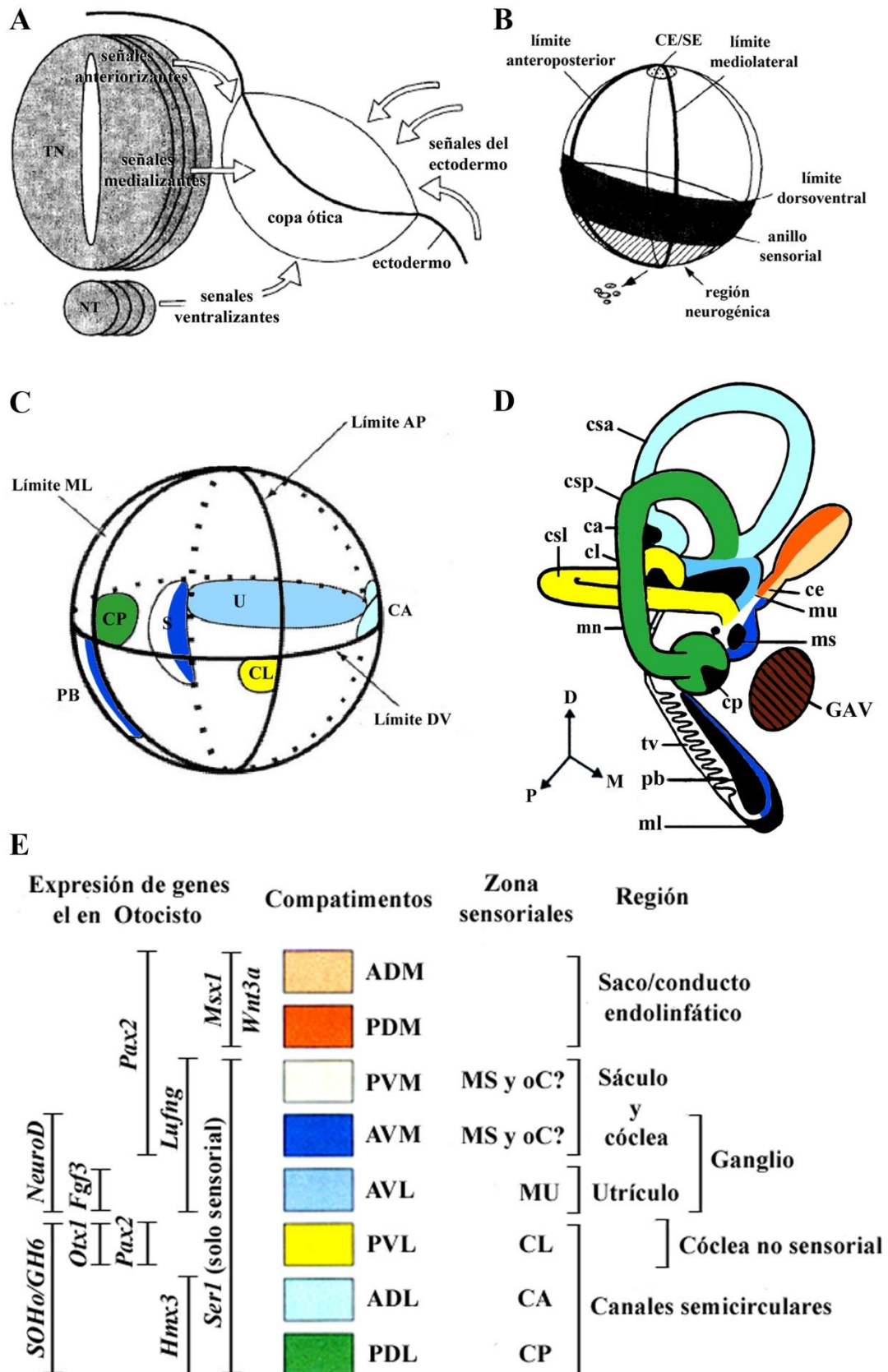




Figura 9.- Formación de compartimentos en el epitelio del esbozo ótico durante el desarrollo embrionario. **(A)** Las señales inductivas que especifican los ejes del epitelio ótico surgen desde diferentes estructuras, incluyendo el tubo neural (TN), notocorda (NT) y la superficie del ectodermo. **(B)** Representación de los límites que se producen por el enfrentamiento de distintos dominios de expresión génica. La región neurogénica (rayado) se especifica en el polo ventral, mientras que el sistema endolinfático (SE/CE) se especifica en el polo dorsal. Un anillo de células con competencia sensorial es creado (sombreado gris claro y medio), aunque solamente un pequeño número de estas células formará parte de los elementos sensoriales. **(C)** División de la vesícula ótica en ocho porciones y formación de los elementos sensoriales en los límites entre ellos. **(D)** Representación esquemática de un oído adulto de aves, mostrando las estructuras derivadas de los compartimentos propuestos en el otocisto (comparar con los colores utilizados en **C**). **(E)** Propuesta de la expresión de genes reguladores, compartimentos generados y las zonas o regiones generadas. Adaptado de Fekete (1996) (**A** y **B**); Brigande *et al.* (2000b) (**C**); Fekete y Wu (2002) (**D** y **E**).

Basándose en la teoría de los compartimentos limitados, Brigande y colaboradores (2000b) propusieron el siguiente modelo para facilitar el entendimiento de la formación de los elementos sensoriales. (1) El oído interno se segrega en dominios de linaje restringidos (compartimentos), definidos por amplios territorios de expresión de factores de transcripción. (2) La identidad de los compartimentos especificaría las partes estructurales del oído interno (canales semicirculares, utrículo, sáculo, cóclea, conducto endolinfático) y (3) la localización de los órganos sensoriales, así como (4) la migración de los precursores neuronales, todo ello por medio de señales de corto rango. (5) Los órganos sensoriales se formarían adyacentes a los límites definidos por estos dominios de expresión génica. (6) La identidad del compartimento también podría determinar el tipo de órgano sensorial: los órganos sensoriales alargados requerirían la intersección de sólo dos compartimentos para definir su localización espacial (órgano de Corti, en mamíferos; papila basilar, en vertebrados no mamíferos; o las máculas vestibulares), mientras que los órganos sensoriales puntuales, las crestas, requerirían la intersección de al menos tres compartimentos (Brigande *et al.*, 2000b; Fig. 9).

3. Especificación de los elementos sensoriales y no sensoriales durante el desarrollo del epitelio ótico

Los primeros estudios morfológicos sugirieron que los diferentes elementos sensoriales del oído interno de aves surgirían de un engrosamiento de la región ventromedial del epitelio del esbozo ótico, detectable aproximadamente en el estadio de vesícula ótica (Knowlton, 1967). En embriones de peces, las máculas vestibulares y las

crestas parecen originarse de una misma zona, denominada mácula común, localizada también en la porción ventro-medial del epitelio ótico (Haddon y Lewis, 1996; Millimaki *et al.*, 2007; Sweet *et al.*, 2011). La existencia de este simple dominio pro-sensorial fue también apoyado por los estudios de la proteína BEN, una molécula de adhesión (Goodyear *et al.*, 2001). Goodyear y colaboradores mostraron que el dominio BEN positivo marcaba, entre otros tejidos, una banda ventro-medial la cual se subdividía sucesivamente en todos los elementos sensoriales del oído interno de aves a partir del estadio HH22 en adelante. Dentro del epitelio ótico, el estudio de los patrones de expresión de los genes *Serrate1* y *LFng*, dos componentes de la vía de Notch, ha permitido caracterizar, al menos parcialmente, algunos aspectos moleculares implicados en la especificación de este dominio con competencias sensoriales (Adam *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 2000). Como alternativa, el origen de los diferentes elementos sensoriales podría surgir de un territorio ventral dispuesto alrededor de todo el esbozo ótico, a modo de anillo, propuesto como modelo de posibles compartimentos estancos en el desarrollo del oído interno de aves (Fekete, 1996; Fig. 9B).

Por otra parte, los trabajos de Wu y Oh (1996) han propuesto que los elementos sensoriales surgen de manera independiente los unos respecto de los otros, tal y como fue mostrado por el estudio de la expresión de *Bmp4*. En aves, la expresión de *Bmp4* se localiza primeramente en dos regiones, anterior y posterior de la vesícula ótica. El dominio anterior daría lugar a la cresta anterior, mientras que el dominio posterior daría lugar a varios elementos sensoriales caudales: la cresta posterior, la mácula neglecta y la papila basilar. Un tercer dominio *Bmp4* positivo aparecería posteriormente en la parte más lateral del esbozo ótico, correspondiendo con la cresta lateral, que parece surgir *de novo*, seguido de un dominio amplio situado en la región antero-medial, el cual daría lugar a la mácula del utrículo y del sáculo. Se especuló que el origen de todos estos dominios *Bmp4* positivos podrían estar determinados por los límites de expresión de otros genes reguladores (Wu y Oh, 1996). La aparición de los distintos elementos sensoriales en zonas aisladas del epitelio ótico, *de novo*, fue sugerido también por la expresión de *p75NGFR* (Von Bartheld *et al.*, 1991), *BDNF* (Hallbook *et al.* 1993) y *Msh1* (Wu y Oh, 1996).



4. Factores de transcripción y moléculas de señalización para el correcto desarrollo del oído interno

Como se ha mencionado anteriormente, la especificación del epitelio ótico podría ocurrir por medio de una regionalización inicial del epitelio ótico generada por las expresiones asimétricas de genes específicos, cuyos límites pueden definir compartimentos restringidos de linaje celular, y por la interacción de señales locales (Fekete, 1996; Brigande *et al.*, 2000b; Fekete y Wu, 2002; Kil y Collazo, 2002). Por consiguiente, el conocimiento de la expresión de diferentes familias de factores de transcripción y moléculas de señalización nos pueden ayudar a comprender la especificación regional, la gangliogénesis y la innervación inicial de los elementos sensoriales en el desarrollo del oído interno. Por ello, mediante la técnica de hibridación *in situ*, sería interesante encontrar algunos de estos amplios dominios de expresión génica.

El estudio de algunos patrones de expresión han sugerido que el sistema endolinfático se originaría en el polo dorsal del esbozo ótico por la intersección de dos límites. Mapas de destino utilizando DiI han situado el desarrollo del sistema endolinfático en la confluencia de los límites antero-posterior y medio-lateral, los cuales podrían actuar como líneas de restricción clonal (Brigande *et al.*, 2000a,b). En aves y mamíferos, la expresión de *Pax2* y *EphA4* se localizan en la pared medial del oído interno, confirmando parcialmente esta hipótesis (Rinkwitz-Brandt *et al.*, 1996; Nornes *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 1996; Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). La expresión de genes de la familia *Hmx* podrían definir la porción lateral del esbozo ótico, asociada a la formación de los canales semicirculares, y en cuyos límites podrían diferenciarse varios elementos sensoriales, en particular las crestas (Kiernan *et al.*, 1997). Esta porción lateral podría estar también definida por la expresión fuerte de *SOHo-1*, su expresión débil marca las futuras crestas (Kiernan *et al.*, 1997). El desarrollo de la cresta lateral y su canal semicircular asociado estaría controlado por la expresión de *Otx1* o *Hmx3*, en ratón; la cresta lateral desaparece en mutantes con alteraciones de estos genes (Acampora *et al.*, 1996; Morsli *et al.*, 1999). El enfrentamiento del dominio de expresión de ambos genes definiría un límite en torno al cual se definiría el territorio presuntivo de la cresta lateral (Brigande *et al.*, 2000b). Por otra parte, se ha indicado que la expresión de *Pax2* podría definir la porción ventral del esbozo ótico, y así contribuir al desarrollo del conducto coclear, dado que ratones mutantes de este gen no presentan

sistema auditivo (Torres *et al.*, 1996). Resultados similares se han mostrado al analizar la expresión de *Nkx5.1* (*Hmx3*), *sek1* (*EphA4*) y algunos miembros de la familia *Irx* (Rinkwitz-Brandt *et al.*, 1996; Bosse *et al.*, 1997). No obstante, estos resultados contrastan con los obtenidos en el desarrollo de aves, en donde la expresión de *Pax2* marcaría otros compartimentos (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). Además, no hay marcadores que permitan situar con claridad la disposición del límite antero-posterior, por lo que hace difícil localizar el territorio presuntivo de la papila basilar u órgano de Corti respecto de la mácula del sáculo. La separación entre la mácula del sáculo y del utrículo o la separación entre los canales semicirculares anterior y posterior queda por ser determinada en el contexto de esta hipótesis (ver Fekete y Wu, 2002; Fig. 9D,E).

A pesar de todos estos trabajos, la subdivisión del epitelio ótico en dominios por límites abruptos de expresión génica aun no ha sido mostrada. Los estudios descritos anteriormente han sido realizados en diferentes especies y en diferentes estadios del desarrollo, lo que hace difícil extraer cualquier conclusión coherente. Sería necesario la selección de algunos genes claves y la realización de un estudio sistemático, por ejemplo en aves, una especie muy utilizada como modelo experimental.

OBJETIVOS

En la actualidad, uno de los objetivos principales en el estudio del desarrollo del oído interno es determinar los factores moleculares y celulares implicados en los procesos inductivos del esbozo ótico, así como en la especificación y determinación de los diferentes elementos sensoriales y no sensoriales que se desarrollan a partir del epitelio ótico. Señales procedentes del tubo neural, el ectodermo cefálico, el mesénquima subyacente y los arcos faríngeos podrían regular estos procesos durante los estadios iniciales del desarrollo.

Por ello, en este capítulo de la Tesis Doctoral, hemos abordado los siguientes objetivos:

1. Describir exhaustivamente los patrones de expresión tanto espaciales como temporales de los siguientes factores de transcripción y moléculas de señalización: *Meis2*, *Raldh3*, *Otx2* y *Fgf10*. Con ello, se pretende conocer el posible papel de dichos factores de transcripción y moléculas de señalización en la especificación de diferentes estructuras durante el desarrollo del oído interno.
2. Comprobar si la expresión de estos genes forman compartimentos dentro del epitelio ótico, acorde con la teoría de los compartimentos limitados.
3. Estudiar la posible interacción entre estos genes, a través de sus patrones de expresión, especialmente en la especificación y segregación de los diferentes elementos sensoriales del oído interno.

Estos trabajos descriptivos se realizarán en el desarrollo embrionario del oído interno de *Gallus gallus* (pollo), entre los estadios 18 al 34 de Hamburger y Hamilton (1951). Compararemos la expresión de estos genes con la expresión del gen *Bmp4*, un marcador de los elementos sensoriales del oído interno de aves durante el desarrollo embrionario (Wu y Oh, 1996; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004), y con la inervación de dichos elementos por axones del ganglio acústico-vestibular (GAV; Álvarez *et al.*, 1989; revisado por Fritsch, 2003; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004), utilizando el anticuerpo 3A10 (Sánchez-Guardado *et al.*, 2009, 2011a, 2012). Otros marcadores específicos han sido también utilizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material de estudio

En los diferentes experimentos, se utilizaron embriones de pollo (*Gallus gallus*, variedad Leghorn blanco). Los huevos fueron incubados en una estufa sin volteo, en un intervalo de temperatura que oscila entre los 37-38°C y con humedad relativa constante. Los embriones usados para los patrones de expresión fueron extraídos entre los estadios HH18 y HH36 (10 días de incubación), según Hamburger y Hamilton (1951).

2. Preparación del material

2.1. Fijación

Los embriones fueron extraídos de los huevos y depositados en una placa Petri con PBS 0,1M. Mediante el empleo de una lupa binocular, se procedió a la determinación de su estadio de desarrollo, según las tablas de Hamburger y Hamilton (1951). A continuación, se procedió a la fijación de los embriones usando paraformaldehído al 4%, diluido en tampón fosfato salino (PBS) 0,1M, pH7,4, a 4°C. Los embriones más pequeños, desde HH18 hasta HH30 (E7), fueron fijados por inmersión, con una duración que dependía del estadio (entre 4 y 8 horas). El resto de embriones fueron fijados primeramente por perfusión intracardiaca y posteriormente por inmersión durante 24 horas a 4°C.

2.2. Congelación

Una vez fijados los embriones, el material fue lavado repetidas veces con PBS 0,1M durante 48 horas y, a continuación, se pasaron a una solución de PBS 0,1M y sacarosa (10%), en la que se mantuvieron entre 24-48 horas a 4°C. Lo que se pretende con esta solución es crioproteger las muestras.

Posteriormente, las piezas se pasaron a otra solución compuesta por PBS 0,1M, sacarosa (10%) y gelatina (10%), durante 30 minutos a 37°C. Con este paso, conseguimos que la solución de sacarosa/gelatina envuelva por completo a la pieza y le de consistencia.

Al mismo tiempo que se embebían los embriones en la solución de sacarosa/gelatina, se añadieron 2 ml de dicha solución en una bandeja de plástico de 5x5 cm, que se colocó a 4°C hasta la solidificación de la mezcla. A continuación, la pieza con la solución de sacarosa/gelatina se colocó en la bandeja de plástico, sobre la base



sólida de sacarosa/gelatina. Luego, se le añadió más solución sobre la pieza hasta cubrirla por completo. Después, se dejó a 4°C durante aproximadamente 15 minutos con el fin de que se solidifique la solución de sacarosa/gelatina y se forme un bloque compacto. Cuando la mezcla estaba sólida, se sacó la pieza de gelatina de la bandeja de plástico y, bajo una lupa, se cortó en bloques más o menos cúbicos con una cuchilla. Después se talló el bloque con la pieza debidamente orientada contendrá en su centro.

A continuación, el bloque se congeló a -70°C. Para ello se utilizó alcohol isopropílico (2-propanol) al que se le añadió hielo seco (o nieve carbónica) para alcanzar una temperatura comprendida entre -60 y -75°C.

Previamente, habíamos recortado un cuadrado de 2x2 cm de una lámina de corcho de 3 mm de espesor. Sobre su anverso, anotamos el nombre identificativo o datos del espécimen que se va a congelar. Sobre el reverso, añadimos unas gotas de Tissu-Tek sobre las cuales se colocó el bloque de sacarosa/gelatina que contiene la muestra en su interior. Todo este conjunto (corcho/Tissu-Tek/bloque) se sumergió en el alcohol isopropílico (-70°C) durante 2 minutos. El Tissu-Tek a bajas temperatura solidifica, actuando de pegamento.

Tras la congelación, sacamos el bloque del isopropanol pegado a la lámina de corcho, se secó con un poco de papel secante y se envolvió en papel de aluminio debidamente etiquetado. Las piezas se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser cortadas en el microtomo criostático.

2.3. Microtomía

Los cortes se realizaron en un microtomo criostático con un grosor de 20 µm. Se obtuvieron series alternas para realizar posteriormente las distintas hibridaciones *in situ* y las reacciones inmunocitoquímicas. Los cortes se recogieron en portaobjetos superfrost, se dejaron secar durante 2 horas y se almacenaron posteriormente a -80°C hasta su uso.

3. Síntesis de sonda a partir de plásmidos lineales

Los plásmidos circulares, que contenían las secuencias de los genes de estudio, fueron linealizados con sus correspondientes enzimas de restricción (ver Tabla 1), siguiendo las indicaciones de las correspondientes casas comerciales.

Una vez que tenemos el plásmido linealizado, necesitamos una solución que contiene:

- 2 µl de tampón 10x (*Buffer*).
- 2 µl de una preparación de nucleótidos que lleva: ATP, GTP, CTP, UTP y UTP-digoxigenina.
- 1 µl de inhibidor de RNAsa.
- 1 µl de polimerasa (T3, T7 o Sp6).
- 1 µg de plásmido lineal (DNAI).
- Agua esteril MiliQ.

El volumen de agua esteril MiliQ utilizado sería el necesario para obtener el volumen final de 20 µl, lo cual depende de la concentración de plásmido lineal utilizado.

Tras preparar la solución en un eppendorf estéril, la incubamos durante 2 horas a 37°C. A continuación, añadimos 1 µl de DNAsa I y dejamos que actúe durante 45 minutos a 37°C para que destruya el DNA. Con esto conseguimos tener solo nuestro RNAm. Precipitamos el RNAm (sonda) obtenido en la solución de síntesis, añadiendo 80 µl agua estéril, 10 µl LiC₄ y 300 µl etanol 100%, y dejamos la mezcla unas 12 horas (toda la noche) a -20°C. Después, centrifugamos a velocidad máxima durante aproximadamente 30 minutos a 4°C, eliminamos el sobrenadante y quedándonos con el pellet. Luego, lavamos el pellet con etanol al 70% y etanol absoluto. Colocamos los eppendorf durante 2 minutos a 37°C en la estufa para evaporar los restos de etanol. Posteriormente, resuspendemos el precipitado en 20 µl de agua estéril. El siguiente paso, fue comprobar, mediante un gel de electroforesis, si los fragmentos obtenidos corresponden con el tamaño esperado. Una vez comprobado que el fragmento es el de nuestro interés, le añadimos 20 µl de formamida para proteger la sonda y almacenarla a -20°C.



Tabla 1. Información sobre las sondas y anticuerpos usados

SONDAS DE RNA					
Gen	*NCBI	Posición	Tamaño Inserto	Enzima/Polimerasa Antisentido	Referencia/laboratorio
Bmp 4	NM_205237.1	1–807	806	ClaI/T7	Sánchez-Guardado <i>et al.</i> , 2009
Bmp 7	XM_417496.3	706–1.680	975	XhoI/T3	Merino <i>et al.</i> , 1999
Cath 1	CR_40596.1	1.843–2.743	899	NotI/T3	EST clone: ChEST686k4
Delta 1	NM_204973.1	1.596–2.183	588	NotI/T3	Adam <i>et al.</i> , 1998
Fgf 10	NM_204696.1	214–900	686	NcoI/Sp6	Alsina <i>et al.</i> , 2004
Fgf 19	NM_204674.1	366–1.160	795	NotI/T3	EST clone: ChEST230k6
FGFR 3	NM_205509.2	1–678	677	BamHI/T7	Birmingham-McDonogh <i>et al.</i> , 2001
Hes 5	NM_001012695.1	1–1.188	1188	NotI/T3	Fior y Henrique, 2005
LFn	NM_204948.1	2.190–2.663	473	NotI/T3	EST clone: ChEST378f3
Meis 1	AF202933	121–716	595	SpeI/T7	Ferran <i>et al.</i> , 2007
Meis 2	AF199011	134–728	594	SphI/Sp6	Ferran <i>et al.</i> , 2007
Msx 1	NM_205488.2	588–1.309	721	NotI/T3	EST clone: ChEST325e24
Otx 2	NM_204520	30–899	869	BamHI/ T7	Sánchez-Calderón <i>et al.</i> , 2004
Raldh 3	NM_204669.1	476–1.501	1.025	XhoI/Sp6	Sánchez-Guardado <i>et al.</i> , 2009
Serrate 1	XM_415035.3	436–1.141	706	HindIII/T7	Adam <i>et al.</i> , 1998
Sox 2	NM_205188.1	462–1.013	552	SalI/T7	Uchikawa <i>et al.</i> , 1999
ANTICUERPOS					
Anticuerpo	Antígeno	Dilución	Identificación de anticuerpo		
3A10	Asociado a neurofilamentos	1/80	Sánchez-Guardado <i>et al.</i> , 2012		
BEN	Neuronas periféricas, precursores hematopoyéticos, Linfocitos Tinmaduros y activos	1/100	Pourquié <i>et al.</i> , 1990; Bardet <i>et al.</i> , 2006; Sánchez-Guardado <i>et al.</i> , 2012		
Anti-mouse IgG	Mouse IgG	1/100	Sánchez-Guardado <i>et al.</i> , 2012		
Anti-Digo AP	Digoxigenina	1/3.500	Sánchez-Guardado <i>et al.</i> , 2012		

*National Center for Biotechnology Information

4. Hibridación *in situ* sobre secciones de criostato

1^{er} día

Los cortes, obtenidos en el microtomo criostático y almacenados a -80°C, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 ó 2 horas. Con esto conseguimos que los cortes queden bien adheridos a los portas, impidiendo su desprendimiento durante todo el procesamiento.

Una vez secos, los cortes fueron postfijados con paraformaldehído 4% en PBS 0,1 M durante 10 minutos, con el fin de eliminar toda la actividad enzimática del tejido. Después, se lavó el material 3 veces durante 10 minutos con PBS 0,1 M, haciendo siempre un primer lavado rápido para eliminar de forma masiva el paraformaldehído. A continuación, se procedió a la acetilación. Con este paso, se evitan las uniones no específicas de las sondas debido a los grupos amino de las proteínas cargados positivamente. La reacción de acetilación se llevó a cabo durante 10 minutos en agitación en un medio que contenía: 234 ml de agua, 4,2 ml de trietanolamina, 420 µl de HCl y 600 µl de acetato anhidro. Luego, permeabilizamos el material con Tritón X-100 al 1% en PBS 0,1 M durante 30 minutos. Después, se lavaron las secciones 3 veces durante 5-10 minutos con PBS 0,1 M y, en la campana de gases, se incubaron con el tampón de hibridación (TpH) en horizontal (cámaras húmedas) durante 2 horas. El tampón de hibridación estaba compuesto por: 50% de formamida, 10% de dextran sulfato, 5x de solución Denhardt, 250 mg/ml de tRNA, y solución Salt. La solución Salt contiene: NaCl 0,2 M; Tris-HCl 10 mM; Tris-Base 1 mM, NaH₂PO₄-2H₂O 5 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, y EDTA 0,5 M. Todos estos pasos fueron realizados a temperatura ambiente.

Tras la incubación con el TpH, diluimos la sonda en un eppendorf a una proporción 1/200 en el mismo tampón (aproximadamente 200-300 ng/ml). Dicha solución fue colocada durante 5 minutos en el baño térmico a unos 80°C. Con esto conseguimos que la sonda se desnaturalice, obteniendo cadenas monocatenarias, para que puedan hibridar correctamente. Una vez desnaturalizada, el eppendorf se introdujo en hielo durante 5 minutos para estabilizar las cadenas monocatenarias. Después, agitamos con el vortex para mezclar bien la sonda y, en la campana de gases, dispensamos 180 µl de la solución (sonda-TpH) y colocamos un cubreobjetos sobre los



portas para que se extienda por todas las secciones y estén todas bien cubiertas con dicha solución. Luego, colocamos las cámaras húmedas en la estufa a 72°C y dejamos incubando durante 12 horas (toda la noche).

2º día

Tras la incubación toda la noche con la sonda a 72°C, calentamos una solución de citrato salino estándar (SSC) al 0,2x a 72°C en el baño térmico. Quitamos los cubreobjetos de los portaobjetos e introducimos dichos portaobjetos en vertical en la solución SSC 0,2x previamente calentada, que volvemos a meter en el baño térmico a 72°C durante 45 minutos. Luego, realizamos un lavado con SSC 0,2x a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente, se realizaron otros 3 lavados de 5 minutos cada uno con la solución B1 (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 100 mM; Triton X-100 0,1%). A continuación, colocamos los portaobjetos en horizontal (cámara húmeda) y dispensamos en cada uno 300 µl de la solución de bloqueo (B2; B1 + NGS 10 % + Lisina 10 %) durante 1 hora. Por último, preparamos la solución con el anticuerpo antidigoxigenina (anti-Digo, AP; Roche) diluido en la solución B1 + NGS 1 %, en una proporción de 1/3.500, y dispensamos 300 µl de dicha solución sobre las secciones en horizontal e incubamos durante 12 horas (toda la noche) a temperatura ambiente.

3^{er} día

Realizamos 3 lavados en vertical con la solución B1 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, le damos dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente en la solución B3 (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM; Tween 20 0,1 %). Este paso se realiza para cambiar el pH del medio. Luego, colocamos 300 µl de la solución B4 (B3 + NBT/BCIP; Roche) en cada portaobjetos e incubamos en cámaras húmedas a temperatura ambiente, controlando el tiempo y observando el revelado al microscopio. Para la observación al microscopio, los portas se ponen en tampón B3 y, si queremos seguir con la reacción, volvemos a poner otros 300 µl de solución B4.

Finalmente, las secciones se lavaron varias veces con PBS-T (0,05 % de Tritón X-100 en PBS 0,1 M) para eliminar la solución de revelado y proceder al montaje con Moviol. Para ello, ponemos unas gotas de Moviol sobre las secciones y colocamos un cubreobjetos, tapando todas las secciones y evitando que no queden burbujas. El Moviol

está compuesto por: glicerol 30 %, polivinil alcohol 40-88 12 % y Tris-HCl 120 mM pH 8,5.

5. Inmunohistoquímica

Al igual que en la hibridación *in situ*, los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 ó 2 horas. Luego, se lavaron con PBS-T, para permeabilizar el tejido, 2 veces durante 10 minutos. A continuación, se incubaron los cortes en cámara húmeda durante 2 horas con una solución de bloqueo (lisina monoclórhydrato 0,1 M, normal goat serum (NGS) 10 % en PBS-T), para reducir las uniones inespecíficas. Como la inmunohistoquímica con el anticuerpo 3A10 siempre se hizo después de la hibridación *in situ*, y tiene un paso de bloqueo (solución B2, en el día 2), este paso nos lo saltamos.

Después, las secciones se incubaron con los anticuerpo primarios monoclonales 3A10 (1/80; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Universidad de Iowa, IA) o anti-BEN (1/100; DSHB) en PBS-T con NGS al 1 %, durante toda la noche en cámaras húmedas (ver Tabla 1).

El anticuerpo 3A10 ha sido usado como marcador de neuronas diferenciadas en el desarrollo del sistema nervioso de pollo (Yamada *et al.*, 1991; Storey *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 1999). En el desarrollo del oído interno, el anticuerpo 3A10 es una herramienta útil para marcar los axones de las neuronas del ganglio acústico-vestibular (GAV), permitiendo identificar los presuntivos epitelios sensoriales (Adam *et al.*, 1998; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004, 2005, 2007a; Battisti y Fekete, 2008; Sienknecht y Fekete, 2008, 2009; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009, 2011a, 2012). Mientras que el anticuerpo anti-BEN reconoce moléculas de adhesión celular de la superfamilia Ig en la superficie celular de las neuronas que proyectan periféricamente (Pourquié *et al.*, 1990) y proyecciones olivocerebelosas (Chédotal *et al.*, 1996). La inmunoreactividad de BEN también fue detectada en el epitelio ótico y axones del oído interno en desarrollo (Goodyear *et al.*, 2001).

Al día siguiente, las secciones se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS-T. Después, se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario (1/100; GAM, *Anti-Mouse IgG-Biotinilado*, Sigma) 1%). Pasadas las 2 horas, se volvió a lavar 3 veces



durante 10 minutos con PBS-T. Tras los lavados, las secciones se incubaron 2 hora con el complejo extravidin-biotina-peroxidasa (Sigma) en una dilución 1/200. Posteriormente, las secciones se volvieron a lavar 3 veces durante 10 minutos con PBS-T y, además, se le dieron otros 2 lavados de 10 minutos cada uno con Tris 0,1 M (pH 7,5).

Por último, se reveló la actividad peroxidasa con una solución que contenía el cromógeno diaminobencidina (DAB) al 0,03 % y agua oxigenada al 0,005 % en Tris 0,1M pH 7,5, para las secciones tratadas con el anticuerpo 3A10. Mientras que la solución de revelado de las secciones tratadas con el anticuerpo anti-BEN, contenía diaminobencidina (DAB) al 0,03 %, sulfato de níquel y amonio al 0,6 %, y agua oxigenada al 0,005 % en Tris 0,1M pH 7,5. La solución de revelado debe ser preparada en el momento de uso y protegida de la luz. Todos los pasos llevados a cabo durante la inmunohistoquímica fueron realizados a temperatura ambiente.

Finalmente, las secciones se lavaron varias veces con PBS-T para eliminar la solución de revelado y se procedió al montaje con Moviol.

RESULTADOS

1. Expresión de los genes *Meis2/Raldh3/Otx2/Fgf10* en el estadio de vesícula ótica (HH18-20)

1.1. Porción dorso-lateral de la vesícula ótica

Los genes *Meis* (*myeloid ecotropic viral integration site*) pertenecen a la superfamilia TALE (*three-amino-acid loop extension*) (Bertolino *et al.*, 1995; Bürglin, 1997). Estudios en diversos organismos han mostrado que el patrón de expresión de los genes *Meis* puede intervenir en la regionalización temprana y la posterior subdivisión funcional antero-posterior durante la morfogénesis de diferentes órganos (ver Sánchez-Guardado *et al.*, 2011b). No obstante, existen pocos estudios de los genes *Meis* en el desarrollo del oído interno de vertebrados (Zerucha y Prince, 2000; Hisa *et al.*, 2004; Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a).

En secciones transversales a través de la vesícula ótica de aves, la expresión de *Meis2* se detecta restringida al epitelio dorso-lateral de la vesícula ótica, que dará lugar a la bolsa vertical y horizontal, correspondiente al territorio presuntivo de los futuros canales semicirculares (Fig. 10A; Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a).

1.2. Porción dorso-medial de la vesícula ótica

El ácido retinoico (AR), una hormona esteroidea formada a partir del retinal en mamíferos o de β -carotenos en aves, afecta a numerosos acontecimientos del desarrollo embrionario, regulando el crecimiento, diferenciación y supervivencia celular (Ross *et al.*, 2000; Gavalas, 2002). En el desarrollo embrionario del oído interno, el AR activaría la transcripción de genes diana por medio de su unión a receptores nucleares específicos, regulando al menos parcialmente mecanismos moleculares y celulares implicados en el desarrollo del oído interno (Mark y Chambon, 2003; Romand *et al.*, 2006a). De esta manera, el exceso o déficit de AR induce defectos muy severos en el desarrollo de este complejo elemento sensorial (Romand *et al.*, 2006a, Clagett-Dame y Knutson, 2011; Rhinn y Dollé, 2012).

Estudios detallados sobre la expresión espacio-temporal de las enzimas implicadas en la síntesis del AR, las retinaldehído deshidrogenasas (RALDH1-4) han mostrado que, a diferencia de mamíferos (Romand *et al.*, 2006b), RALDH3 es la única enzima encargada de la elaboración del AR en el epitelio del oído interno de aves



(Sánchez-Guardado *et al.*, 2009). En la vesícula ótica de aves, la expresión de *Raldh3* comienza a detectarse en la porción dorso-medial del epitelio otico (Fig. 10B; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009), como había sido descrito previamente por Blentic (2003). El dominio *Raldh3* positivo fue observado en la pared ótica más cercana al tubo neural. Este dominio de expresión corresponde al territorio presuntivo del sistema endolinfático (Torres y Giráldez, 1998; Fekete y Wu, 2002; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009). En este estadio del desarrollo, el área de expresión de *Meis2* se enfrenta al dominio de expresión de *Raldh3* (comparar cabezas de flecha en Fig. 10A y B), ambos territorios siendo excluyentes en la parte dorsal del esbozo ótico.

1.3. Porción ventro-lateral de la vesícula ótica

En vertebrados, existen dos miembros de la familia de los genes *Otx* (*Otx1* y *Otx2*), ortólogos del gen *orthodenticle* (*otd*) de *Drosophila melanogaster* (Acampora *et al.*, 1999). En el desarrollo del sistema nervioso, ambos genes *Otx* están implicados en la especificación de su región anterior (Hidalgo-Sánchez *et al.*, 2005). En los órganos de los sentidos, tales como en el oído interno, ojo y el epitelio olfatorio, la alteración de la expresión de *Otx1* y *Otx2* afecta a la formación de estos órganos sensoriales (Matsuo *et al.*, 1995; Acampora *et al.*, 1996, 2000; Morsli *et al.*, 1999; Cantos *et al.*, 2000; Beisel *et al.*, 2005).

En el estadio de vesícula ótica, la expresión de *Otx2* se localiza en la pared lateral del esbozo del conducto coclear, (Fig. 10C), correspondiente al territorio presuntivo del *tegmentum vasculosum* (Sánchez-Calderón *et al.*, 2002, 2004). Dicha expresión constituye un dominio ventro-lateral en la vesícula ótica. En secciones transversales, podemos observar que el territorio de expresión de *Meis2*, dorso-medial, se enfrenta al dominio *Otx2* positivo, ventro-lateral (comparar flechas en Fig. 10A,C).

1.4. Porción ventro-medial de la vesícula ótica

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGF; *Fibroblastic Growth Factor*) son moléculas de señalización implicadas en la especificación del destino celular, además de controlar la proliferación, migración y supervivencia de diferentes poblaciones celulares en numerosos sistemas, mediante la unión a receptores específicos, los FGFRs, miembros de la familia tirosina quinasa (Polanska *et al.*, 2009; Knights y Cook, 2010). En el desarrollo del sistema nervioso, estos factores difusibles

están implicados en la inducción temprana del destino neural (Diez-del-Corral y Storey, 2004; Wittler y Kessel, 2004; Heisenberg y Solnica-Krezel, 2008), así como en la regionalización del sistema nervioso central (Echevarría *et al.*, 2005; Hidalgo-Sánchez *et al.*, 2005). Dada su presencia en el epitelio del esbozo ótico, algunos de los miembros de la familia FGF son importantes candidatos para dirigir la regionalización del laberinto membranoso, así como la morfogénesis del oído interno (Hidalgo-Sánchez *et al.*, 2000; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004, 2007b; Schimmang, 2007; Kelly y Chen, 2009; Domínguez-Frutos *et al.*, 2009; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012; Vendrell *et al.*, 2012). De entre todos los FGFs, el FGF10, ha recibido un gran interés por el gran número de eventos que regula durante el desarrollo de una amplia variedad de órganos (Ohuchi *et al.*, 2000, 2005; Bates, 2011; ver Sánchez-Guardado *et al.*, 2012).

En el desarrollo del oído interno de vertebrados, la expresión del gen *Fgf10* se detectada por primera vez en la placoda ótica (Pirvola *et al.*, 2000; Alsina *et al.*, 2004). En la vesícula ótica, el dominio de expresión de *Fgf10* forma una banda antero-posterior en su región ventro-medial (Alsina *et al.*, 2004; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012). De esta manera, la expresión del gen *Fgf10* definiría un dominio ventro-medial (Fig. 10D; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012), del cual derivan gran parte de los elementos sensoriales del oído interno de aves (ver más adelante; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012). La expresión de *Raldh3* forma un gradiente dorso-ventral, delimitando ventralmente el territorio sensorial, *Fgf10* positivo (comparar flechas grandes en Fig. 10B y D) (ver Sánchez-Guardado *et al.*, 2009, 2012). Además, la expresión de *Fgf10* parece enfrentarse al dominio *Otx2* positivo (comparar flechas pequeñas en Fig. 10C y D).

1.5. Regionalización del epitelio de la vesícula ótica

Con intención de analizar en detalle la posible regionalización del epitelio ótico en el estadio de vesícula ótica, hemos realizado hibridaciones *in situ* dobles con sondas para estos cuatro genes analizados: *Meis2* con *Fgf10* (Fig. 10E-G) y *Otx2* con *Raldh3* (Fig. 10H-J). En la porción dorsal del esbozo ótico, la expresión de *Meis2* (* en Fig. 10E,F) y *Raldh3* (* en Fig. 10H) son complementarias (comparar cabezas de flechas grandes en Fig. 10E y H). En la región medial de la vesícula ótica (Fig. 10F,I), el dominio de débil expresión de *Meis2* (* en Fig. 10F) se enfrenta al territorio de fuerte expresión de *Fgf10* positivo (** en Fig. 10F), justo en la parte anterior de la vesícula ótica (ver cabeza de flecha grande en Fig. 10F). En un corte inmediatamente ventral a

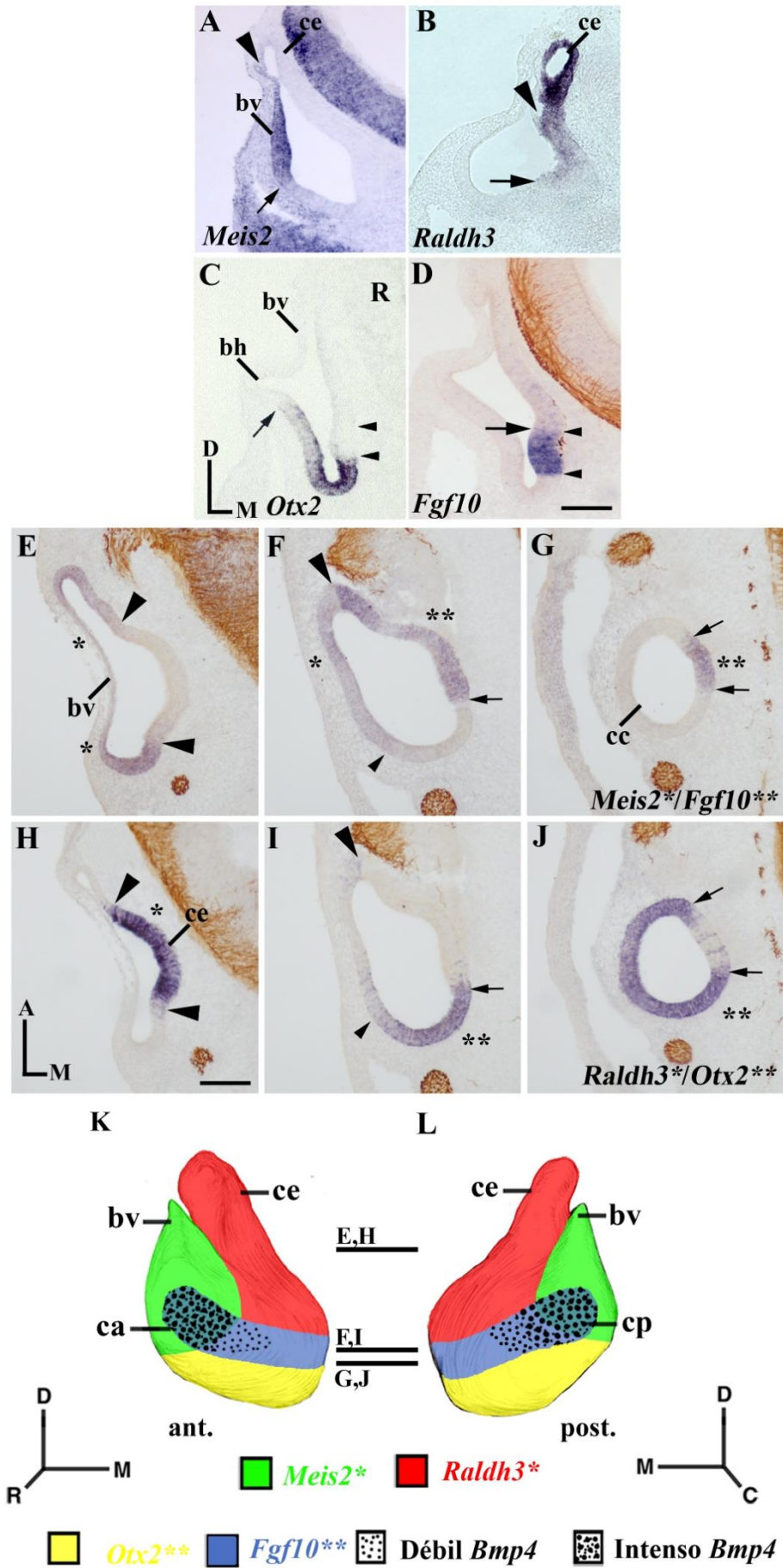


anteriormente descrito (Fig. 10I), se empieza a observar la expresión de *Otx2* de manera muy suave en la parte lateral de la pared ótica, indicando la proximidad del dominio ventro-lateral marcado por su expresión (Fig. 10C), y más fuerte en la pared posterior (** en Fig. 10I). Es interesante resaltar que, a este nivel, el dominio *Otx2* positivo se enfrenta al dominio *Fgf10* positivo (comparar flechas pequeñas en Fig. 10F y I). En secciones horizontales más ventrales, la expresión de *Otx2* marca casi la totalidad del epitelio ótico, salvo una porción situada en la parte medial de la vesícula ótica (entre flechas pequeñas en Fig. 10J). Aunque un número reducido de células *Otx2* positivas parecen dispersarse en la pared medial, este territorio *Otx2* negativo expresa el gen *Fgf10* (** en Fig. 10G; comparar también flechas pequeñas en Fig. 10G y J).

La Figura 10K y 10L muestran un diagrama tridimensional con una visión anterior y posterior del esbozo del oído interno en estadio HH18-20. En estos esquemas se resumen los patrones de expresión de los cuatro genes comentados anteriormente.

----->

Figura 10. Secciones transversales (A-D) y horizontales (E-J) de la vesícula ótica (HH18-20), tratadas con una, en secciones transversales, o dos sondas, en secciones horizontales, para los genes *Meis2*, *Raldh3*, *Otx2* y *Fgf10*. En secciones transversales, la expresión de estos genes definen cuatro dominios: dorso-lateral (*Meis2* positivos; A), dorso-medial (*Raldh3* positivo; B), ventro-lateral (*Otx2* positivo; C) y ventro-medial (*Fgf10* positivos; D). (E, J) Hibridaciones *in situ* en secciones horizontales con dos sondas, ambas reveladas en azul, muestra el enfrentamiento entre los dominios de expresión delimitados por estos genes. Uno o dos asteriscos indican a qué gen corresponde el marcaje en estas dobles hibridaciones *in situ*. Las flechas y las cabezas de flechas marcan las interacciones de los territorios analizados. (K, L) Esquemas tridimensionales de la visión anterior (K) y posterior (L) de la vesícula ótica, donde se representan la expresión de los distintos genes (*Meis2**-verde; *Raldh3**-rojo; *Otx2*** -amarillo; *Fgf10*** -azul). Los diferentes niveles de expresión del gen *Bmp4* han sido también indicados. Los planos de cortes de las secciones horizontales se indican en K y L. Orientación: A, anterior; C, caudal; D, dorsal; M, medial, R, rostral. La barra de aumentos en D indica 44 µm (aplicado a A-D) y en H indica 36 µm (aplicado a E-J).





2. Expresión de los genes *Meis2/Raldh3/Otx2/Fgf10* en el estadio HH24

En estadio HH24, el oído interno de pollo sufre importantes cambios morfogénéticos (Fig. 11). En la porción dorsal del epitelio otico aparece la bolsa vertical (bv; Fig. 11A,B) localizada dorso-lateralmente, de la cual se desarrollaran los canales semicirculares anterior y posterior. Dichos conductos membranosos están asociados con la cresta anterior y posterior, respectivamente. El canal semicircular lateral se desarrolla de la bolsa horizontal (bh; Fig. 11C), en la porción más lateral, la cual está relacionada con la cresta lateral (cl). En la porción dorso-medial del oído interno emerge el conducto endolinfático (ce; Fig. 11C), el cual se expande en su porción más distal formando el saco endolinfático (se). La mácula del utrículo (mu) y la mácula del sáculo (ms) adoptan posiciones centrales en la estructura vestibular. El conducto coclear surge de la porción ventro-medial del oído interno (cc; Fig. 11B-D), extendiéndose hacia la parte ventral del rombencéfalo (R; Fig. 11B,D). La papila basilar (pb) (órgano de Corti en mamíferos) se desarrolla en la pared medial de este conducto coclear (pb; Fig. 11B,D).

En secciones transversales a través del oído interno de estadio HH24 (Fig. 11A-D), la expresión de *Meis2* fue observada en la bolsa vertical y horizontal (* en Fig. 11A,B). El dominio de expresión fuerte de *Meis2* delimita la cresta anterior, la cresta lateral y cresta posterior (no mostrado; ver Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a). Algunas células que expresan débilmente *Meis2* fueron observadas en las crestas, *Fgf10* positivas (no mostrado). En el vestíbulo, la mácula del utrículo y el sáculo no estaban marcadas por el gen *Meis2*. De hecho, el dominio de expresión de *Meis2* se encuentra delimitando dorsalmente la mácula del utrículo, formando un borde bastante definido (no mostrado; Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a). Por la pared lateral del oído interno, *Meis2* forma un gradiente dorso-ventral, llegando casi a solaparse con la expresión de *Otx2* en su porción más anterior (comparar cabezas de flecha grandes en Fig. 11A,C). Una débil expresión de *Meis2* se extiende un poco por la pared lateral del conducto endolinfático (no mostrado; Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a). Por otro lado, la expresión de *Meis2* nunca fue observada en el conducto coclear (Fig. 11A,B; Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a).

La porción dorso-medial del epitelio ótico continúa siendo definida por una fuerte expresión de *Raldh3*, correspondiente al conducto y saco endolinfático (* en Fig.

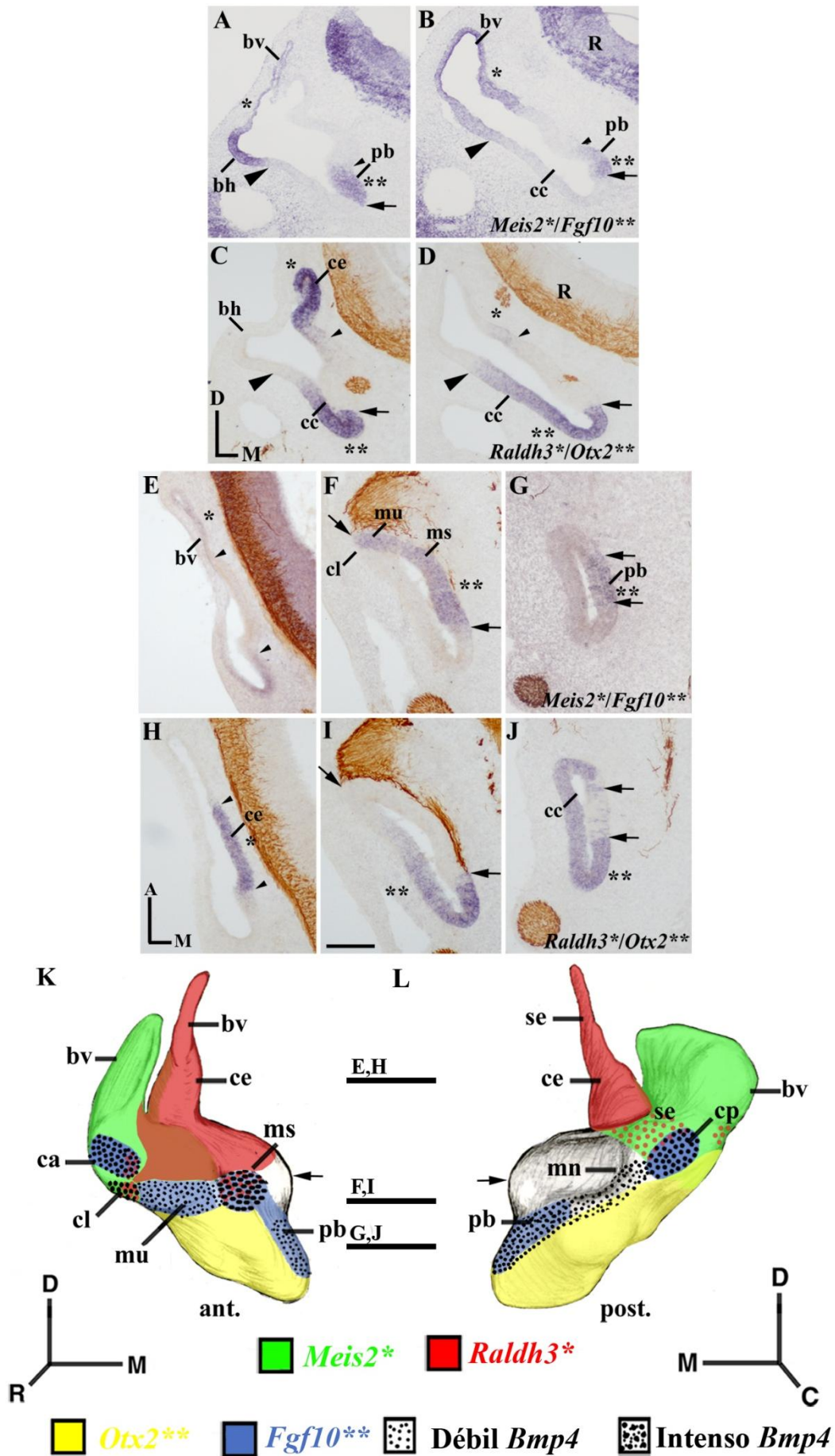
11C,D; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009). En secciones horizontales, el dominio de expresión de *Raldh3* se encuentra delimitado por la expresión de *Meis2* a nivel de la inserción del sistema endolinfático al vestíbulo (comparar cabezas de flecha pequeñas en Fig. 11E,H). Además, dicho dominio de expresión se encuentra delimitando dorsalmente la mácula del utrículo y la mácula del sáculo (no mostrado; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009), ambos elementos sensoriales marcados por la expresión de *Fgf10* (ver más adelante; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012). El conducto coclear es negativo para *Raldh3* (Fig. 11C).

En este estadio, la expresión de *Otx2* se hace evidente en el epitelio del conducto coclear, principalmente en su pared lateral (cc; ** en Fig. 11C,D,I,J; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004). La expresión de *Otx2* se encuentra delimitando el dominio *Fgf10* positivo observado en el conducto coclear (comparar flechas en Fig. 11A-D, F,G,I,J). No obstante, algunas células *Otx2* positivas se encuentran dentro de dicho dominio *Fgf10* positivo (comparar flechas en Fig. 11G,J).

La Figura 11K y 11L muestran diagramas tridimensionales de una vista anterior y posterior, respectivamente, del esbozo del oído interno en estadio HH24. En estos esquemas se resumen los patrones de expresión de los cuatro genes comentados anteriormente. Resaltar que la parte postero-medial del vestíbulo no está marcada por ninguno de los genes analizados (flechas en Fig. 11K).

-----►

Figura 11. Secciones transversales (A-D) y horizontales (E-J) de la vesícula ótica (HH24) con hibridaciones *in situ* dobles, reveladas en azul. La expresión de *Meis2* fue detectada en la bolsa vertical y horizontal (* en A,B,E). *Fgf10* se observó en la pared ventro-medial (** en A,B,F,G), asociado a los elementos sensoriales especificados en este estadio. La expresión de *Raldh3* fue observada principalmente en la porción dorso-medial del epitelio otico, el sistema endolinfático (* en C,D,H). La expresión de *Otx2* se restringe a la pared lateral del conducto coclear (** en C,D,I,J). Las flechas y las cabezas de flechas marcan las interacciones de los territorios analizados. Esquemas de la visión anterior (K) y posterior (L) de la vesícula ótica donde se representan la expresión de los distintos genes (*Meis2**-verde; *Raldh3**-rojo; *Otx2*** -amarillo; *Fgf10*** -azul). La flecha indica el territorio sin marcaje para estos cuatro genes. Los diferentes niveles de expresión del gen *Bmp4* han sido también indicados. Los planos de cortes de las secciones horizontales se indican en K y L. Orientación: A, anterior; C, caudal; D, dorsal; M, medial; R, rostral. La barra de aumentos en I indica 50 µm (aplicado a A-J).



3. Expresión de los genes *Meis2/Raldh3/Otx2/Fgf10* en el estadio HH27

En estadio 27, el esbozo del oído interno adopta una apariencia más madura. Todos los elementos sensoriales y no sensoriales del oído interno de pollo están bien definidos (Wu y Oh, 1996; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004, 2005, 2007a). Los resultados obtenidos del análisis de la expresión de los genes *Meis2*, *Raldh3*, *Otx2* y *Fgf10* han sido descrito previamente (*Meis2*: Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a; *Raldh3*: Sánchez-Guardado *et al.*, 2009; *Otx2*: Sánchez-Calderón *et al.*, 2004; *Fgf10*: Sánchez-Guardado *et al.*, 2012). En este apartado, nos centraremos en la relación entre estos patrones de expresión en el contexto de la regionalización del epitelio ótico. Por simplificar, los resultados se mostrarán en esquemas tridimensionales de un oído interno de estadio HH27 (Fig. 12).

La expresión de *Meis2* se mantiene en la bolsa vertical y horizontal (Fig. 12 ver Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a). La expresión de *Meis2* se extiende hacia el sistema endolinfático, siendo ahora un pequeño área de la pared lateral del conducto endolinfático *Meis2* positivo. En este estadio de desarrollo, todas las crestas, junto con la mácula neglecta, presentan una débil expresión de *Meis2*. La mácula del utrículo y la del sáculo no muestran expresión de *Meis2*. Ambos elementos sensoriales se encuentran delimitados por el dominio de expresión de *Meis2* dorsal y lateralmente, respectivamente. En el conducto coclear la expresión de *Meis2* nunca fue detectada (Fig. 12A; Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a).

La expresión de *Raldh3* fue evidente en el conducto y saco endolinfático (Fig. 11B; ver Sánchez-Guardado *et al.*, 2009). Esta expresión de *Raldh3* se extiende dorso-lateralmente hacia la porción más ventral de la bolsa vertical. Células *Raldh3* positivas fueron también detectadas entre los axones en el borde de todas las crestas. La fuerte expresión de *Raldh3* claramente se detiene en el límite de la mácula del utrículo y la mácula del sáculo, en las cuales algunas células comienzan a expresar *Raldh3* débilmente. Células que expresen *Raldh3* no fueron detectadas ni en la mácula neglecta ni en la mácula de la lagena, estos elementos sensoriales están situados en la parte proximal y distal del conducto coclear, respectivamente. En la porción proximal del conducto coclear, algunas células expresan bajos niveles de *Raldh3* en su porción anterior, cercanos a la mácula del sáculo. Algunas células localizadas en el epitelio posterior expresan el gen *Raldh3* levemente, asociadas a la papila basilar pero sin



presentar células que expresen *Raldh3* en su interior (Fig. 12B; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009).

Una débil expresión de *Raldh3* fue también observada en la porción central de la bolsa vertical, un área que podría corresponder con la futura placa de fusión (Fekete *et al.*, 1997). Con respecto a los elementos sensoriales dorsales, el gen *Raldh3* muestra un doble gradiente decreciente de expresión en la pared medial del oído interno, el cual se extiende desde su área central hacia la cresta anterior, rostralmente, y hacia la mácula neglecta y cresta posterior, caudalmente. El dominio de expresión de *Raldh3* delimita al menos parcialmente estos elementos sensoriales (Fig. 12B; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009).

La expresión de *Otx2* continúa detectándose en la porción ventro-lateral del oído interno (Fig. 12C; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004). Dicha expresión fue observada entre la mácula del utrículo y la mácula del sáculo delimitándolas medial y lateralmente, respectivamente. Además, la expresión de *Otx2* se extiende ventralmente por la pared lateral conducto coclear, excluyendo a la papila basilar y la mácula de la lagena (Fig. 12C; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004).

En el estadio HH27, todos los epitelios sensoriales podrían ser fácilmente reconocibles por marcadores convencionales y/o inervación de las zonas sensoriales. La expresión de *Fgf10* se muestra fuerte en todos los elementos sensoriales, excepto en la inervada mácula neglecta, la cual está próxima a la cresta posterior (Fig. 12D; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012). Dicha mácula neglecta presenta una débil expresión de *Fgf10* en su porción más dorsal. La expresión de *Fgf10* hace evidente la separación entre algunos elementos sensoriales (Fig. 12D; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012).

El gen *Bmp4* ha sido propuesto como un buen marcador de los elementos sensoriales en desarrollo (Oh *et al.*, 1996; Wu y Oh, 1996). Tras examinar la expresión de *Bmp4* en el estadio 27, hemos observado un área que expresaba *Bmp4* en la parte posterior del oído interno, el cual no estaba marcado por *Fgf10*. Este área *Bmp4* positivo, corresponde a una porción abneural del conducto coclear (Oh *et al.*, 1996; Wu y Oh, 1996; Cole *et al.*, 2000; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012). Por lo tanto, podemos concluir que la expresión de *Bmp4* no se restringe a los elementos sensoriales en desarrollo, no siendo por ello un buen marcador sensorial.

La Figura 12 A-D muestra diagramas tridimensionales de una vista anterior y posterior del esbozo del oído interno en estadio HH27. En estos esquemas se resume los patrones de expresión de los cuatro genes comentados anteriormente. Resaltar que, en este estadio del desarrollo, sus patrones de expresión se solapan en gran medida, a diferencia de lo que se observaba en el estadio HH24 (Fig. 11).

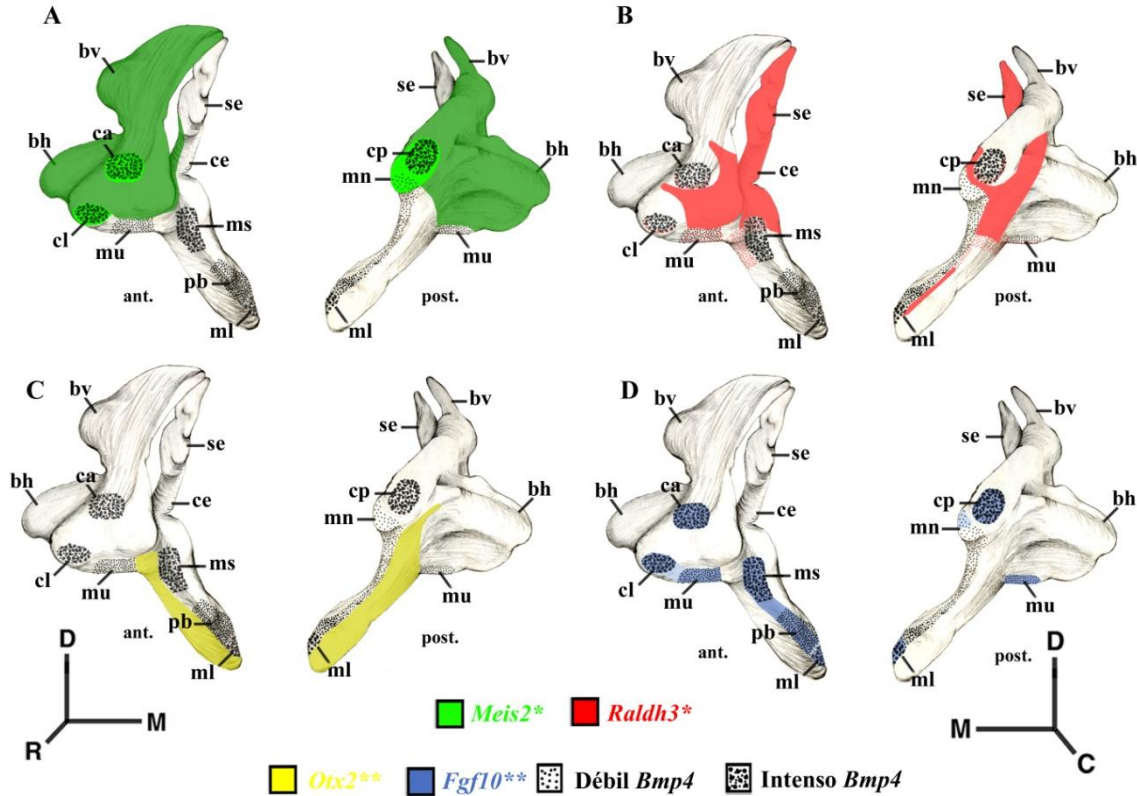


Figura 12. (A-D) Esquemas de la visión anterior y posterior del oído en donde se representan la expresión de los distintos genes (*Meis2**-verde; *Raldh3**-rojo; *Otx2***-amarillo; *Fgf10*** -azul). (A) La expresión de *Meis2* fue detectada en las bolsas de los canales semicirculares, y más débilmente en las tres crestas. La expresión de *Meis2* se observa bordeando la mácula del utrículo y la del sáculo. (B) La expresión de *Raldh3* es evidente en el sistema endolinfático y en el área más ventral de la bolsa vertical. Se observan células dispersas entre los axones de los bordes de todas las crestas. La mácula del utrículo y sáculo son bordeadas por la expresión de *Raldh3*, e incluso algunas células lo expresan débilmente dentro de estos elementos sensoriales. Células *Raldh3* positivas fueron localizadas en el epitelio posterior del conducto coclear. (C) *Otx2* se expresa en la pared lateral del conducto coclear y en la separación entre el territorio de la mácula del utrículo y el sáculo. (D) La expresión de *Fgf10* es claramente apreciable en todos los elementos sensoriales, excepto en la mácula neglecta. Notar los huecos de expresión de *Fgf10* entre la cresta anterior y cresta lateral. Un estudio comparado muestra el grado de solapamiento en la expresión de estos genes. Los diferentes niveles de expresión del gen *Bmp4* han sido también indicados. Orientación: C, caudal; D, dorsal; M, medial; R, rostral. Imagen tomada de Sánchez-Guardado *et al.* (2011a) (A), Sánchez-Guardado *et al.* (2009) (B), Sánchez-Calderón *et al.* (2004) (C), Sánchez-Guardado *et al.* (2012) (D).



4. Expresión de los genes *Meis2/Raldh3/Otx2/Fgf10* en el estadio HH34

Al octavo día de incubación (HH34), el laberinto membranoso del oído interno de pollo presenta su forma madura y una clara regionalización. Todos los elementos sensoriales pueden ser diferenciados histológicamente y morfológicamente.

En el estadio HH34 (E8, Fig.13), la fuerte expresión de *Meis2* se muestra en todas las ámpulas y los canales semicirculares (Fig. 13A; Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a). Sin embargo, una débil expresión de *Meis2* fue observada en el área inervada de todas las crestas y la mácula neglecta. Todo el conducto coclear es negativo para la expresión de *Meis2* (Fig. 13A; Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a).

La expresión de *Raldh3* se observa claramente en el sistema endolinfático y en la porción basal de la cruz común (ccm; Fig. 13B; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009). En este estadio de desarrollo, las diferentes crestas muestran una clara expresión de *Raldh3*, pero de manera discreta. La relación entre las diferentes máculas (mu, ms, mn y ml) aún se mantiene. La expresión de *Raldh3* ahora forma una banda dorso-ventral, que se encuentra bordeando la inervación de la papila basilar caudalmente y rodeando completamente la mácula de la lagena (Fig. 13B; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009).

La expresión de *Otx2* se mantiene en la pared lateral del conducto coclear, en el territorio donde se localiza el *tegmentum vasculosum* (Fig. 13C; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004). El dominio de expresión de *Otx2* se encuentra limitando con la débil expresión de *Fgf10* en la pared anterior del conducto coclear, en un territorio que es no neural. La expresión de *Otx2* forma una banda próximo-distal a lo largo del conducto coclear, introduciéndose en parte dentro del vestíbulo. En el comienzo de esta banda en el vestíbulo, el territorio *Otx2* positivo se encuentra delimitando medialmente la mácula del utrículo y lateralmente la mácula del sáculo, mientras que en su porción distal, se encuentra delimitando ventralmente al territorio sensorial de la mácula de la lagena (Fig. 13C; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004).

La expresión de *Fgf10* fue detectada fuertemente en los ocho elementos sensoriales del oído interno de pollo, estando todos ellos inervados por las dendritas del ganglio acústico-vestibular (Fig. 13D; ver Sánchez-Guardado *et al.*, 2012). Existe un área débilmente marcada por *Fgf10*, que se extiende ventralmente desde la mácula del sáculo y contacta con la papila basilar. Existe también en el conducto coclear, otra área

marcada débilmente por *Fgf10*, que se extiende lateralmente hacia el territorio presuntivo del *tegmentum vasculosum*, el cual puede ser marcado específicamente por la expresión de *Otx2*. Es interesante indicar que la mácula del sáculo y la papila basilar estaban incluidas en una gran banda dorso-ventral *Fgf10* positiva (Fig. 13D; ver Sánchez-Guardado *et al.*, 2012).

La Figura 13 A-D muestran diagramas tridimensionales de una vista anterior y posterior del esbozo del oído interno en estadio HH34. En estos esquemas se resume los patrones de expresión de los cuatro genes comentados anteriormente. Resaltar que, en este estadio del desarrollo, sus patrones de expresión se solapan en gran medida, como se observó en el estadio HH27 (Fig. 12).

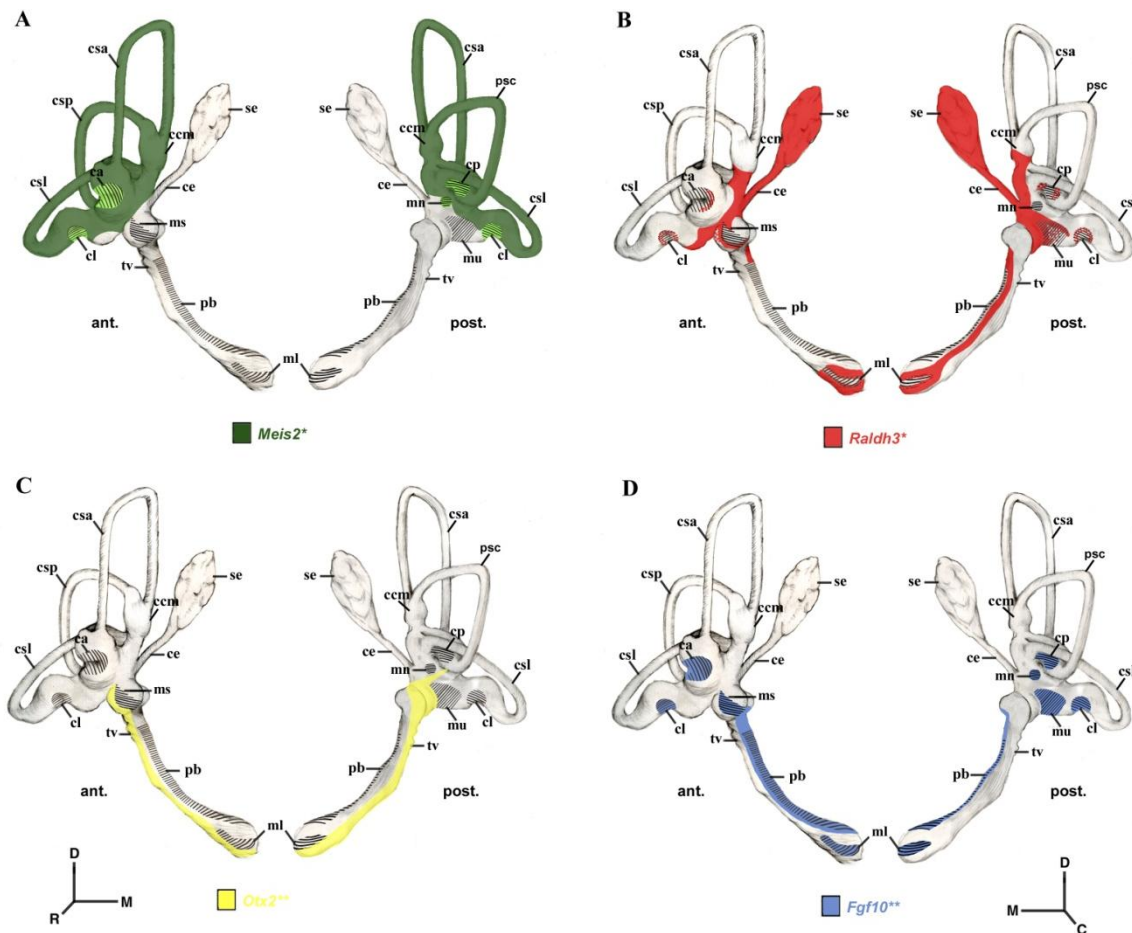


Figura 13. Esquemas de la visión anterior y posterior del oído interno adulto, estadio HH34 (E8), donde se representan la expresión de los distintos genes (A: *Meis2**-verde; B: *Raldh3**-rojo; C: *Otx2*** -amarillo; D: *Fgf10*** -azul). El área rayada representa los elementos sensoriales. Para las abreviaturas, ver lista. Orientación: C, caudal; D, dorsal; M, medial; R, rostral. Imagen tomada de Sánchez-Guardado *et al.* (2011a) (A), Sánchez-Guardado *et al.* (2009) (B), Sánchez-Calderón *et al.* (2004) (C) y Sánchez-Guardado *et al.* (2012) (D).



5. Estudio detallado de la expresión de *Fgf10*

5.1. Patrón de expresión de *Fgf10* en el estadio tardío de vesícula ótica

Como vimos anteriormente en estadio HH18-21, la expresión de *Fgf10* forma una banda antero-posterior, localizada en la parte ventro-medial del esbozo ótico. Este dominio antero-posterior *Fgf10* positivo puede ser observado claramente tanto en secciones transversales (Fig. 14A-D) como horizontales (Fig. 14E). La expresión de *Fgf10* es más intensa en su parte rostral que en la caudal (Fig. 14E). El dominio que está marcando *Fgf10* incluye al menos el territorio presuntivo de la cresta anterior, la cual se encuentra ya inervada por las dendritas óticas marcadas con el anticuerpo 3A10 (ca; Fig. 14A,E), y la cresta posterior (cp; Fig. 14C,D).

Serrate1 (un ligando de los receptores Notch) está también implicado en el regionalización del otocisto de vertebrados (Adam *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 2000; Kiernan *et al.*, 2001; Brooker *et al.*, 2006), definiendo un gran dominio ótico pro-sensorial, antes de que se produzca la diferenciación de las células ciliadas (Abelló y Alsina, 2007). El extenso dominio de expresión *Serrate1* también anuncia la aparición de las zonas sensoriales en el rudimento del oído interno de pollo (Adam *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 2000). En los estadios HH18-20, la comparación en secciones horizontales de los dominios de expresión de *Fgf10* y *Serrate1*, muestran que *Serrate1* se encuentra marcando también una banda antero-posterior más extensa (Fig. 14G), en la cual se incluye la banda marcada por *Fgf10* (comparar cabezas de flecha en Fig. 14F,G).

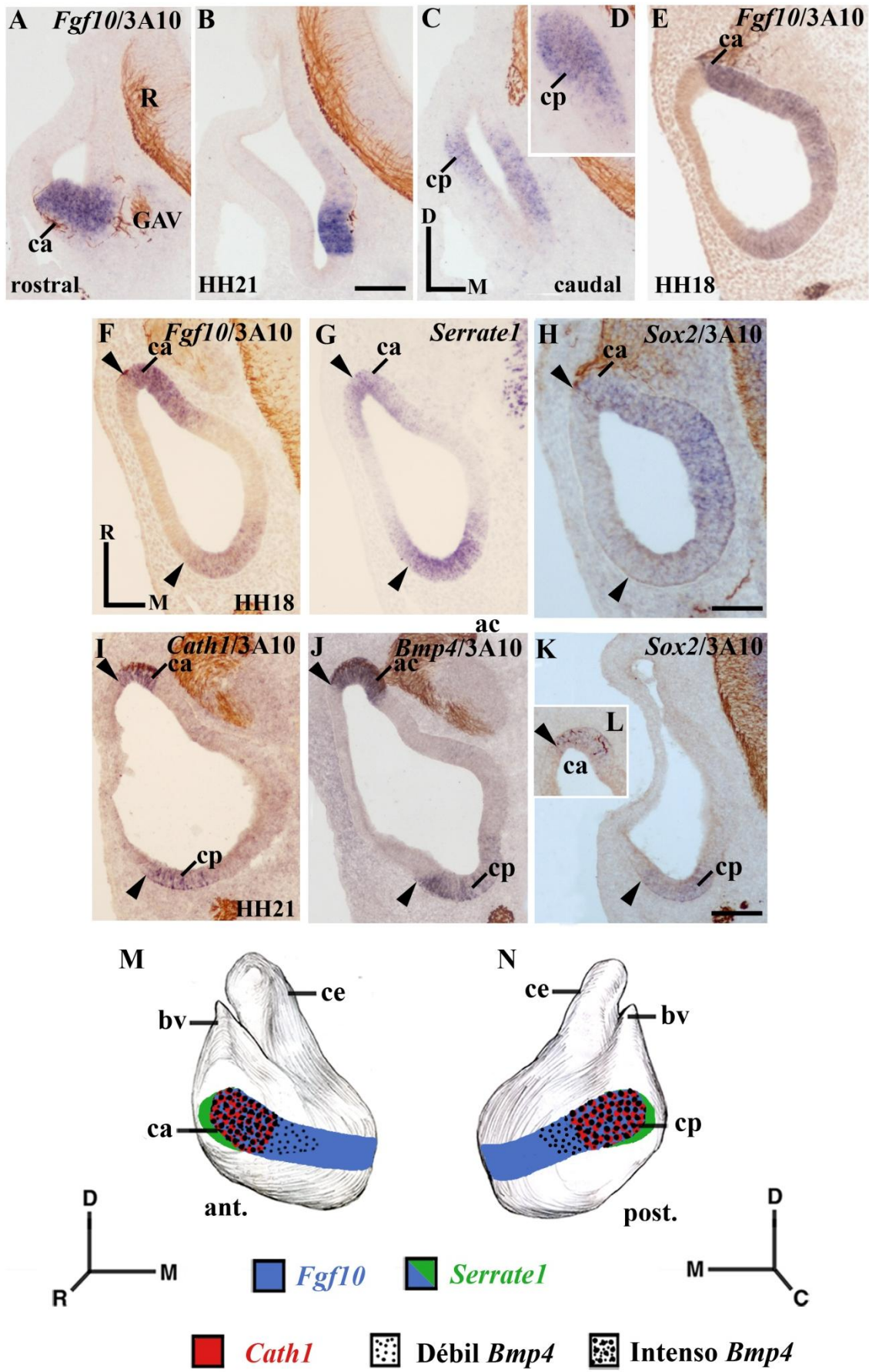
Por otro lado, el gen *Sox2* también parece estar implicado en el desarrollo de los dominios sensoriales del oído interno (Uchikawa *et al.*, 1999; Kiernan *et al.*, 2005, 2006; Daudet *et al.*, 2007; Hume *et al.*, 2007; Neves *et al.*, 2007, 2011, 2012; Babdoub *et al.*, 2008). En el estadio HH18, las células que expresan *Sox2* se detectan en el dominio antero-posterior del rudimento ótico (Fig. 14H). El borde rostral del dominio *Sox2* positivo coincide con el dominio *Fgf10* positivo, pero no su borde caudal (comparar cabezas de flecha en Fig. 14F,H). Según se avanza en el desarrollo (estadio HH21), el dominio de expresión de *Sox2* se extiende caudalmente hasta incluir el territorio presuntivo de la cresta posterior (Fig. 14K), además de la cresta anterior (Fig. 14L).

El gen *Atoh1*, un homólogo cercano de *Atonal* en *Drosophila*, es un gen pro-neural bHLH que se expresa en las zonas sensoriales en el desarrollo del oído interno de

vertebrados. Los genes *Cath1* y *Math1* son requeridos para la diferenciación de las células ciliadas en diferentes filos (Bermingham *et al.*, 1999; Zheng y Gao, 2000; Chen *et al.*, 2002; Kawamoto *et al.*, 2003; Fritzsche *et al.*, 2005; Matei *et al.*, 2005; Pujades *et al.*, 2006; Millimaki *et al.*, 2007, 2010; ver también Fritzsche *et al.*, 2006, 2010). En estadio HH20-21, secciones horizontales a través del desarrollo del oído interno de aves muestran algunas células dispersas *Cath1* positivas en la cresta anterior inervada (ca; Fig. 14I) y en el desarrollo de la zona sensorial posterior, la cual contiene la cresta posterior (cp; Fig. 14I; Wu y Oh, 1996). Estas células que expresan *Cath1* se encuentran en dos áreas que expresan el gen *Bmp4* (Fig. 14J). En estadio HH21, los bordes laterales de los territorios de expresión de *Fgf10*, *Cath1*, *Sox2* y *Bmp4* coinciden (ver cabezas de flecha en Fig. 14I-L; *Fgf10*, no mostrado). En este momento, otros elementos sensoriales no están aun claramente especificados (Wu y Oh, 1996; Oh *et al.*, 1996; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004, 2005, 2007b; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009, 2011a, 2012). La Figura 14M y N muestra diagramas tridimensionales de una vista anterior y posterior de la vesícula ótica, respectivamente (HH21), resumiendo todos los resultados anteriores.

-----►

Figura 14. Patrón de expresión de *Fgf10* en el estadio de vesícula ótica. (A-D) Secciones transversales a través del oído interno de estadio HH21 desde nivel rostral (A) a caudal (D), tratado con la sonda *Fgf10* y el anticuerpo 3A10. La expresión de *Fgf10* muestra una banda rostro-caudal localizada en la porción ventro-medial del esbozo ótico (A-D), que se observa mejor en una sección horizontal en estadio HH18 (E). (E-L) secciones horizontales a través del estadio HH18 (E-H) y HH21 (I-L), tratados con los genes indicados. En estadio HH18, la banda marcada por *Fgf10* incluye el dominio de expresión de *Serrate1* (ver flechas en F,G), mientras que el dominio de expresión de *Sox2* está incluido en la porción antero-medial de la banda *Fgf10* positiva (comparar cabezas de flecha en E,H). En estadios HH21, el dominio de expresión de *Fgf10* contiene la cresta anterior y posterior, *Cath1*, *Sox2* y *Bmp4* positivos (I-L). Esquemas tridimensionales de la visión anterior (M) y posterior (N) de la vesícula ótica, en donde se resumen los patrones de expresión de *Fgf10*, *Serrate1* y *Cath1*, así como la expresión intensa y débil de *Bmp4*. Orientación: C, caudal; D, dorsal; M, medial; R, rostral. La barra de aumentos en B indica 14 µm (aplicado en A-D); en H indica 8 µm (aplicado en E-H); en K indica 9 µm (aplicado en I-L).



5.2. Patrón de expresión de *Fgf10* en estadio HH24

Secciones horizontales del oído interno de estadio HH24 muestran que la expresión de *Fgf10* se observa en varios, pero no en todos, los elementos sensoriales. Las zonas sensoriales que presentan la expresión de *Fgf10* son: cresta anterior (ca) y posterior (cp), mácula del utrículo (mu), sáculo (ms) y de la lagena (ml), y la papila basilar (pb). La cresta lateral (cl) y la mácula neglecta (mn) no están dentro del dominio de expresión de *Fgf10* (Sánchez-Guardado *et al.*, 2012).

En este estadio de desarrollo, la expresión de *Cath1* se detecta en la cresta anterior y posterior (ver Sánchez-Guardado *et al.*, 2012), mientras que algunas células dispersas expresan *Cath1* en la cresta lateral y mácula del sáculo (cl y ms; flechas en Fig. 15B,B'). Es interesante indicar que el territorio presuntivo de la cresta lateral, el cual es débilmente marcado por el gen *Bmp4* (cl; Fig. 15C), está excluido del dominio *Fgf10* positivo. A este nivel, el área de expresión de *Fgf10* muestra un marcado límite justo adyacente a la cresta lateral (comparar cabezas de flecha en Fig. 15A-C).

Para confirmar si el dominio de expresión de *Fgf10* excluye el territorio presuntivo de la cresta lateral en el estadio HH24, hemos usado diferentes marcadores de los elementos sensoriales. La expresión de *Fgf19* fue descrita en la mácula del utrículo, con una intensa expresión en su borde lateral, siendo la cresta lateral *Fgf19* negativa (mu; Fig. 15E; Sánchez-Calderón *et al.*, 2007b). Así, la expresión de *Fgf19* es un buen marcador del límite entre la cresta lateral y la mácula del utrículo. Los límites laterales de los dominios de expresión de *Fgf10* y *Fgf19* coinciden (cabezas de flecha en Fig. 15D,E), corroborando que la cresta lateral es negativa para la expresión de *Fgf10*. El gen *Hes5* (*hairy and enhancer of split*), codifica para uno de los factores de transcripción bHLH, el cual es considerado necesario para el desarrollo del oído interno de vertebrados (Adam *et al.*, 1998; Zine *et al.*, 2001; Kelly y Chen, 2007). En el desarrollo del oído interno de pollo, *Hes5* se expresa en células del dominio pro-neural en estadio de copa ótica (Abelló *et al.*, 2007). También, *Delta1* un ligando de Notch se expresa en diferentes elementos sensoriales durante el desarrollo del oído interno de pollo (Adam *et al.*, 1998; Bryant *et al.*, 2002). En embriones de estadio HH24, el borde lateral de los dominios de expresión de *Hes5* y *Delta1* también coinciden con la de los genes *Fgf10* y *Fgf19* (cabezas de flecha en Fig. 15D-G,I). Por otra parte, el territorio de expresión débil de *Serrate1* se extiende lejos del límite mencionado de los patrones de



expresión anteriores, marcando el territorio presuntivo de la cresta lateral (cl; Fig. 15H), similar a la expresión de *Bmp4* (flecha grande en Fig. 15C).

Otra evidencia de que la cresta lateral está excluida del dominio de expresión de *Fgf10* en los estadios tempranos viene dada por los patrones de expresión de *Sox2* y *Lunatic Fringe (LFng)*, además de la molécula de adhesión celular BEN, tres marcadores postulados para la especificación del epitelio sensorial en el oído interno. *Sox2* está implicado en la diferenciación de los elementos sensoriales del oído interno de vertebrados (Uchikawa *et al.*, 1999; Kiernan *et al.*, 2005, 2006; Daudet *et al.*, 2007; Hume *et al.*, 2007; Neves *et al.*, 2007, 2011, 2012; Dabdoub *et al.*, 2008). En estadio HH24, la expresión de *Sox2* está también ausente en la cresta lateral (cl; cabeza de flecha en Fig. 15J). *LFng*, un homólogo en vertebrados del fringe en *Drosophila*, está implicado en el posicionamiento de los límites durante la embriogénesis (Laufer *et al.*, 1997; Rodríguez-Esteban *et al.*, 1997). Este gen está implicado en la regionalización del oído interno (Laufer *et al.*, 1997; Adam *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 2000). Ha sido descrito que su expresión en la cresta lateral de pollo es aun ausente en estadio HH23/24, pero es evidente en estadio HH25 (Cole *et al.*, 2000). BEN marca una banda en la que se va a desarrollar el epitelio sensorial en pollo, estando directamente implicado en la especificación de la cresta lateral, pero no está claramente demostrado en estadio HH24 (Goodyear *et al.*, 2001). Secciones horizontales a través del estadio HH24 del rudimento ótico muestran que la cresta lateral está claramente excluida de los dominios BEN y *LFng* positivos (cl; cabezas de flecha en Fig. 15K,L).

En la parte caudal del rudimento ótico, la banda continua dorso-ventral de la expresión de *Bmp4*, el cual ha sido propuesto que está implicado directamente en el desarrollo de los elementos sensoriales óticos más caudales en pollo (cresta posterior, macula neglecta, papila basilar, y mácula de la lagena; Wu y Oh, 1996), no corresponde exactamente con el dominio de expresión de *Fgf10*. Hay un área *Fgf10* negativa entre la cresta posterior en el vestíbulo y la zona *Bmp4* positiva en el conducto coclear (cabezas de flecha grandes en Fig. 15A,C). Esta área, que expresa débilmente *Bmp4*, esta innervada por las fibras óticas pioneras 3A10 positivas, aunque no hay células que expresen *Cath1* (cabeza de flecha grande en Fig. 15B). Es tentador asignar este territorio a la futura mácula neglecta, siendo *Bmp4* positiva y *Fgf10* negativa, porque dicha mácula siempre se localiza adyacente a la cresta posterior, un poco ventral y medial a dicha cresta (Wu y Oh, 1996; ver también Sánchez-Calderón *et al.*, 2004,

2005, 2007a; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009, 2011a, 2012). Así, la mácula neglecta, similar a la cresta lateral, parecen estar excluidas de la banda continua antero-posterior de la expresión de *Fgf10* observada en HH18-21 (Fig. 15).

En estadio HH24, un territorio que expresa *Serrate1*, posiblemente correspondiente al esbozo de la mácula neglecta, fue observado en la porción caudal del oído interno (mn; Fig. 15H). En este estadio del desarrollo, muchos de los embriones de pollo tratados con la sonda *Fgf10* y *Sox2* no muestran expresión en este territorio (para *Fgf10*, ver Fig. G,G'; *Sox2* no mostrado), aunque algunos embriones comienzan a expresar muy bajos niveles de dichos genes (para *Sox2*, Fig. 15J; *Fgf10*, Fig. 15J'). Las dendritas de las neuronas del ganglio acústico-vestibular, marcadas por el anticuerpo BEN, son detectadas en este dominio caudal (mn en Fig. 15K; cabezas de flecha en 15K'), localizadas justamente ventral a la cresta posterior, positiva para BEN (no mostrado). Este área *Serrate1* positivo carece de expresión para otros marcadores del epitelio sensorial (*Hes5*, *Delta1*, y *LFng*; Fig. 15F,I,L). Esta porción del epitelio ótico recibe fibras desde el ganglio acústico-vestibular (Fig. 15G-L) y la expresión de *Fgf10* y *Sox2* comienza a observarse, por lo que se podría considerar como el territorio presuntivo de un elemento sensorial, aunque no se observen células ciliadas diferenciadas en estos estadios de desarrollo. Por lo tanto, se podría considerar que este territorio corresponde con la futura mácula neglecta.

En la porción anterior del primordio ótico, un pequeño área del dominio de expresión de *Fgf10* muestra una débil expresión de *Fgf10*, posiblemente sugiriendo que la banda antero-posterior *Fgf10* positiva se está subdividiendo, y la mácula del utrículo y mácula del sáculo comienzan a separarse (flecha en Fig. 15A).

La Figura 15M y N resume los patrones de expresión de *Fgf10* y *Cath1* en el oído interno de estadio HH24. El dominio de expresión de *Fgf10* contiene varios epitelios sensoriales: la cresta anterior (ca), la mácula del utrículo (mu), la mácula del sáculo (ms), la papila basilar (pb), la mácula de la lagena (ml), y la cresta posterior (cp). También se muestra el área de expresión débil de *Fgf10* entre la mácula del utrículo y la del sáculo. Los patrones de expresión de todos los genes estudiados sugieren que el límite entre la mácula del utrículo y la cresta lateral está bien definido en estadio HH24. El territorio de la cresta lateral es negativo para los genes *Fgf10*, *Fgf19*, *Hes5* y *Delta1*, pero positivo para *Serrate1*, *Bmp4* y *Cath1*. La posible localización de la mácula



neglecta, identificada por la expresión de *Serrate1*, comienza a encontrarse dentro del dominio de expresión de *Fgf10*.

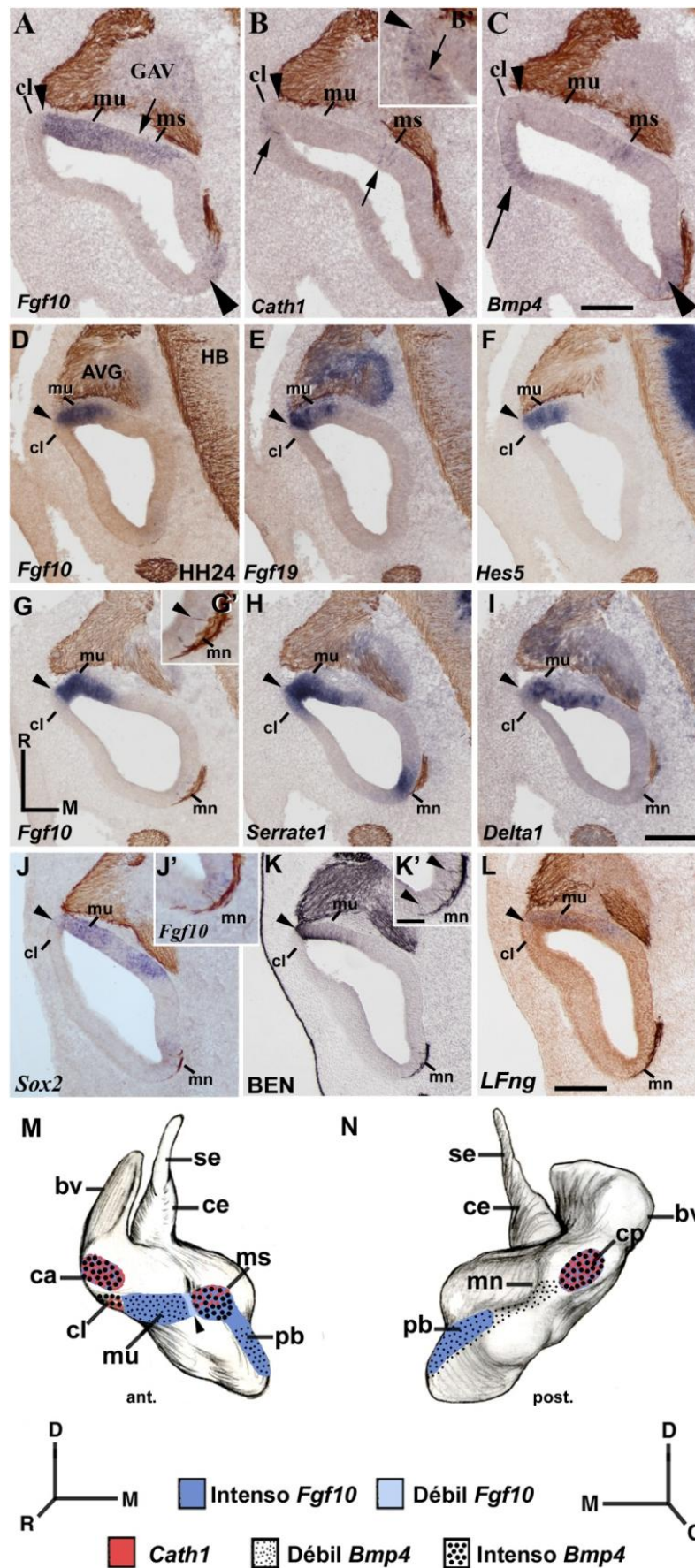


Figura 15. Especificación de la cresta lateral, mácula del utrículo, mácula del sáculo y mácula neglecta en los estadios HH24. Secciones horizontales a través del oído interno tratadas con los marcadores indicados (A-L). A nivel de la cresta lateral y la mácula del utrículo, los bordes de los dominios de expresión de los genes *Fgf10* (A), *Fgf19* (E), *Hes5* (F), *Delta1* (I), *Sox2* (J), BEN (K) y *LFng* (L) son coincidentes, marcando el límite entre la mácula del utrículo/cresta lateral (cabezas de flecha). Este límite coincide con el límite de expresión fuerte de *Serrate1* (cabeza de flecha en H) y con la expresión de *Cath1* y *Bmp4* en la cresta lateral (cabezas de flecha en B,B',C). La cresta lateral está expresando *Serrate1* débilmente (H). En este estadio del desarrollo, la expresión de *Fgf10* es más débil entre la mácula del utrículo y del sáculo. El territorio presuntivo de la mácula neglecta (mn en G-L), innervada por los axones marcados con los anticuerpos 3A10 (cabeza de flecha en G') y BEN (cabezas de flecha en K'), es *Fgf10* negativo y *Serrate1* positivo (mn; G,H). Sin embargo, algunos embriones muestran un marcaje débil de expresión de *Fgf10* (J') y *Sox2* (J) en la futura mácula neglecta, *Bmp4* positiva y *Cath1* negativa (cabeza de flecha grande en B,C). Esquemas tridimensionales de la visión anterior (M) y posterior (N) del esbozo ótico donde se resumen los patrones de expresión de *Fgf10* y *Cath1*. La débil e intensa expresión de *Bmp4* también se representa. La cresta lateral (cl) y la mácula neglecta (mn) son *Fgf10* negativas. Orientación: C, caudal; D, dorsal; M, medial; R, rostral. La barra de aumentos en C indica 40 μ m (aplicado a A-C), en I indica 50 μ m (aplicado en D-I), en indica 15 μ m (aplicado en G',J',K') y en L indica 40 μ m (aplicado en I-L).

5.3. Expresión de *Fgf10* y especificación de los órganos sensoriales en el estadio HH25-26

A los 4,5-5 días de desarrollo embrionario (estadio HH24+-26), los patrones de expresión de los genes considerados anteriormente cambian con respecto al dominio de la cresta lateral (cl; Fig. 16A-F, estadio HH24+; Fig. 16G-L, estadio HH25; Fig. 16M-P, estadio HH26). *Fgf10* comienza a expresarse en la cresta lateral en embriones de estadio HH24+ (ver la baja expresión de *Fgf10* en Fig. 16A; flecha en Fig. 16B). La cresta lateral muestra una expresión más fuerte de *Cath1* (Fig. 16C,D) que en estadios previos (HH24; Fig. 15B). En este momento del desarrollo, *Hes5* empieza a expresarse claramente en la cresta lateral (cl; Fig. 16E; flecha en Fig. 16F), así como *Delta1* (no mostrado). En el estadio HH25 (Fig. 16G-L), la cresta lateral muestra una clara, aunque débil, expresión del gen *Fgf10* (cl; Fig. 16G; flecha en Fig. 16H), dentro de un dominio que expresa *Serrate1* (flecha en Fig. 16J). La expresión de *Fgf10* va acompañada de una mayor expresión de *Delta1* (flecha en Fig. 16K), *Cath1* y *Hes5* (no mostrado). Con respecto al gen *Sox2*, la mayoría de los embriones de estadio HH25 no muestran expresión en la cresta lateral, aunque algunos comienzan a presentar una expresión muy



débil de *Sox2* (cl; Fig. 16L). En el estadio HH26, la expresión de *Fgf10* en la cresta lateral es muy evidente (Fig. 16M), así como la expresión de otros marcadores, tales como *Sox2* (Fig. 16O) y *Hes5* (Fig. 16P).

Respecto a la especificación de la mácula del sáculo y la mácula del utrículo, la bajada de expresión de *Fgf10* entre los dominios presuntivos de ambas máculas se hace más evidente (cabezas de flecha grande en Fig. 16G, estadio HH25; Fig. 16M, estadio HH26) que antes (estadio HH24; Fig. 15A). El progreso en la especificación de ambas máculas se confirma a su vez por la disminución de expresión de *Serrate1*, *Sox2* y *Hes5* en la separación de estas dos máculas (ver cabezas de flechas grande en Fig. 16J,L,O,P).

En relación con la futura mácula neglecta, situada en la parte caudal del oído interno de estadio HH25/26 (Fig. 16G,I,J,L,M-P), este elemento sensorial muestra algunas células que expresan *Fgf10* y *Sox2* en una pequeña porción de su territorio presuntivo (mn; Fig. 16G,I,L,N,O), estando siempre incluida en el territorio que expresa *Serrate1* (mn; Fig. 16J). En estos estadios, esta zona sensorial no expresa ni *Hes5* (mn; Fig. 16P) ni *Delta1* (no mostrado).

Referente al desarrollo de la mácula de la lagena, hemos comprobado si dicho elemento sensorial está incluido en el dominio de expresión de *Fgf10* en estadio HH25-26, usando diferentes marcadores moleculares. La expresión del gen *Bmp7*, el cual está implicado en la especificación de las zonas sensoriales auditivas y vestibulares, ha sido descrita en la mácula de la lagena y la papila basilar conjuntamente (Oh *et al.*, 1996; ver Fig. 16S). Por otro lado, el gen *Msx1* es considerado como un marcador de la mácula de la lagena (Wu y Oh, 1996). RNA mensajeros del gen *Msx1* se detectan específicamente en este elemento sensorial, presente en la parte distal del conducto coclear, pero no en la papila basilar (Fig. 16U). Comparando la expresión de *Bmp7* y *Msx1* con la de *Fgf10* y *Serrate1*, se puede concluir que en estadio HH25-26 el territorio presuntivo de la mácula de la lagena se desarrolla en los dominios de expresión de *Fgf10* y *Serrate1* (Fig. 16Q,R). En este estadio de desarrollo, la mácula de la lagena no muestra expresión para *Sox2* y *FGFR3* (Fig. 16T,V), estando el gen *FGFR3* restringido a la papila basilar (Birmingham-McDonogh *et al.*, 2001). Por lo tanto, en este momento del desarrollo (HH25-26), el territorio presuntivo de la mácula de la lagena se encuentra situado dentro de un dominio *Fgf10* positivo, contiguo al de la papila basilar.

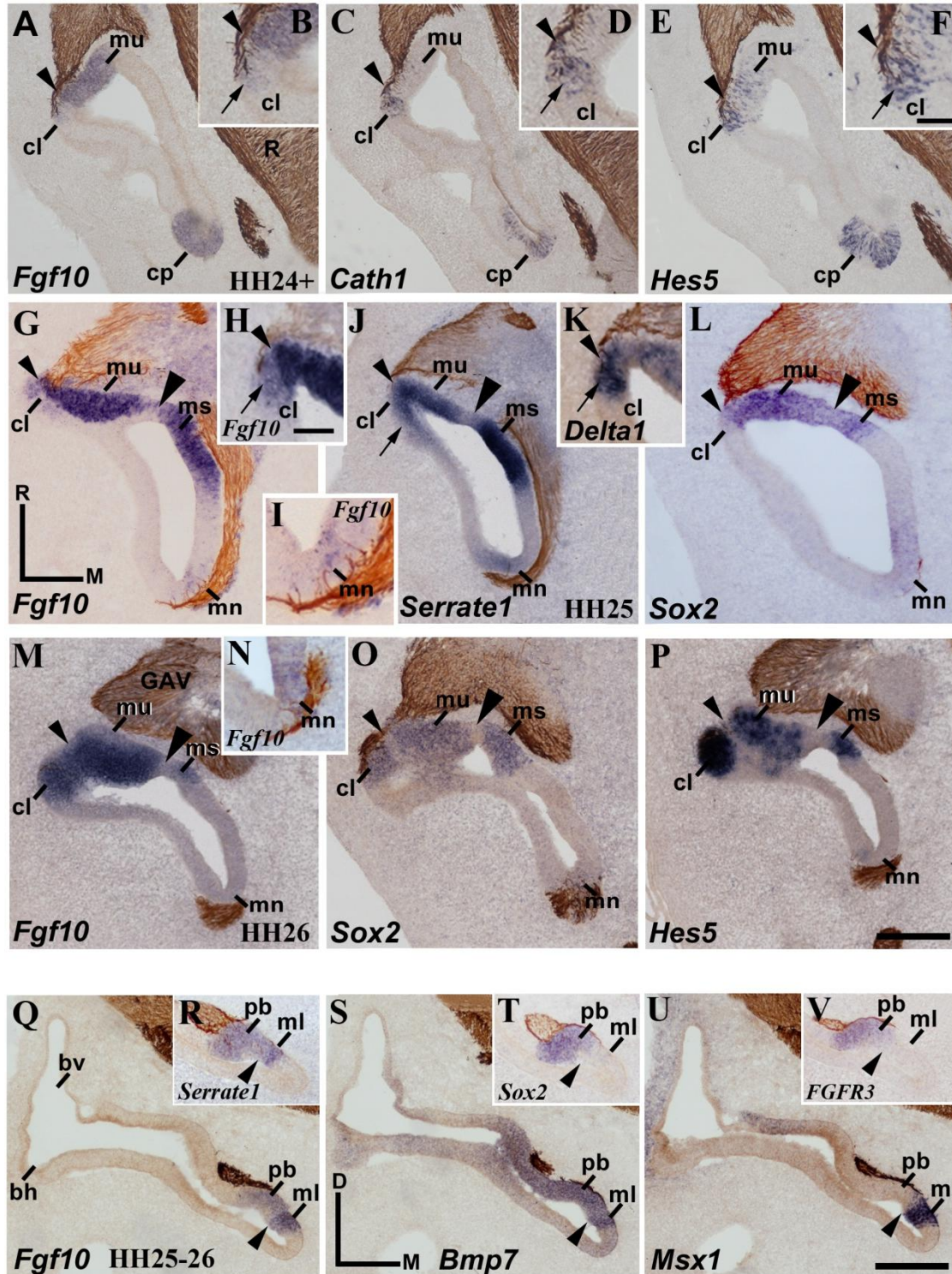


Figura 16. Especificación de la cresta lateral, mácula del utrículo, mácula del sáculo y la mácula neglecta en estadio HH24+-26. Secciones horizontales (A-P) y transversales (Q-V) tratadas con las sondas indicadas en cada imagen y el anticuerpo 3A10. El límite de la cresta lateral/mácula del utrículo se indica con cabezas de flecha (A-H,J-M,O,P). *Fgf10* (A,B,G,H,M), *Cath1* (C,D), *Hes5* (E,F,P) y *Delta1* (K) se observan en la cresta lateral (cl). La expresión de *Sox2* también se detecta en la cresta lateral en estadio HH26 (O), pero no tan evidente en el estadio HH25 (L). Todos estos patrones de expresión se encuentran incluidos en un gran dominio de expresión de *Serrate1* (flecha en J). La separación entre la mácula del



utrículo y la mácula del sáculo es más evidente (cabezas de flecha grandes en G,J,L,M,O,P). La mácula neglecta expresa *Serrate1* (mn; J), mostrando bajos niveles de expresión de *Fgf10* (mn; G,I,M,N) y *Sox2* (mn; L,O), estando ausente la expresión de *Delta1* (no mostrado) y *Hes5* (mn; P). En secciones transversales (Q-V), la mácula de la lagena, *Msx1* positiva (ml; U), se encuentra incluida en los dominios de expresión de *Fgf10* (ml; Q), *Serrate1* (ml; R), y *Bmp7* (ml; S), pero es negativa para *Sox2* y *FGFR3* (ml; T,V). Las cabezas de flecha en Q-V indican el borde entre la papila basilar/mácula de la lagena. Orientación: C, caudal; D, dorsal; M, medial; R, rostral. La barra de aumentos en F indica 15 μ m (aplicado en B,D,F), en H indica 12 μ m (aplicado en H,K,I,N), en P indica 40 μ m (aplicado en A,C,E,G,J,L,M;M,O,P) y en U indica 60 μ m (aplicado en Q-V).

5.4. Expresión de *Fgf10* en estadio HH27

En estadio 27, los progresos morfogénéticos son más evidentes, y todos los elementos sensoriales son más fácilmente reconocibles. En secciones transversales a través del oído interno de estadio HH27 la expresión de *Fgf10* está presente en todos los elementos sensoriales (Fig. 17A-D). La innervación de la mácula neglecta (mn; Fig. 17D), la cual se encuentra en la proximidad del territorio de la cresta posterior, es la última marcada por *Fgf10* (mn; Fig. 17D). La mácula neglect presenta la expresión de *Fgf10* en su parte dorsal (no mostrado) pero no en su parte ventral (Fig. 17D). Este tipo de secciones también muestran que la cresta anterior se encuentra bastante separada de los elementos sensoriales vestibulares (no mostrado). Sin embargo, la cresta lateral y la mácula de la lagena no se han separado de su elemento sensorial cercano en este estadio de desarrollo (la mácula del utrículo y la papila basilar, respectivamente), aunque la expresión de *Fgf10* se hace más débil entre la separación de ambos elementos sensoriales (cabezas de flecha en Fig. 17B,C). Sería interesante resaltar que los dominios presuntivos de la mácula del sáculo y la papila basilar están incluidos en una banda continua dorso-ventral de expresión de *Fgf10*, presentando una expresión homogénea (Fig. 17B).

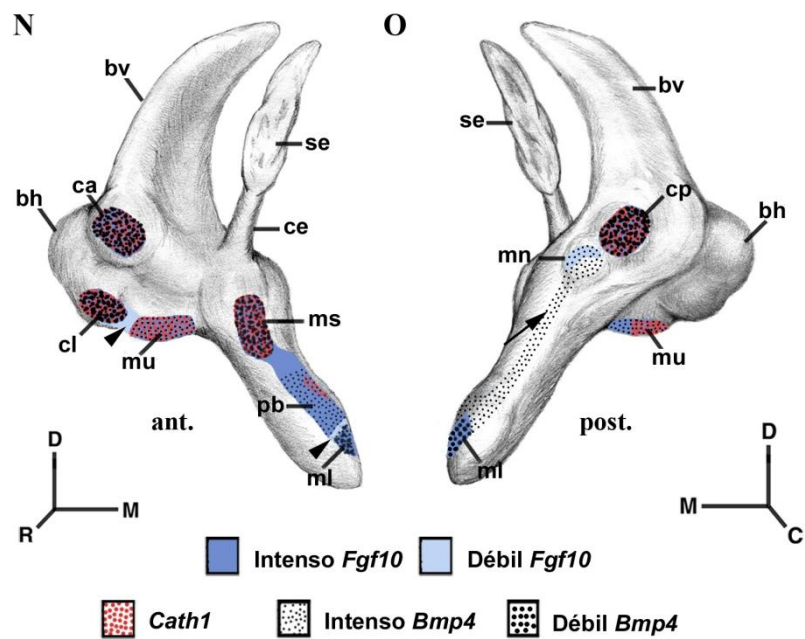
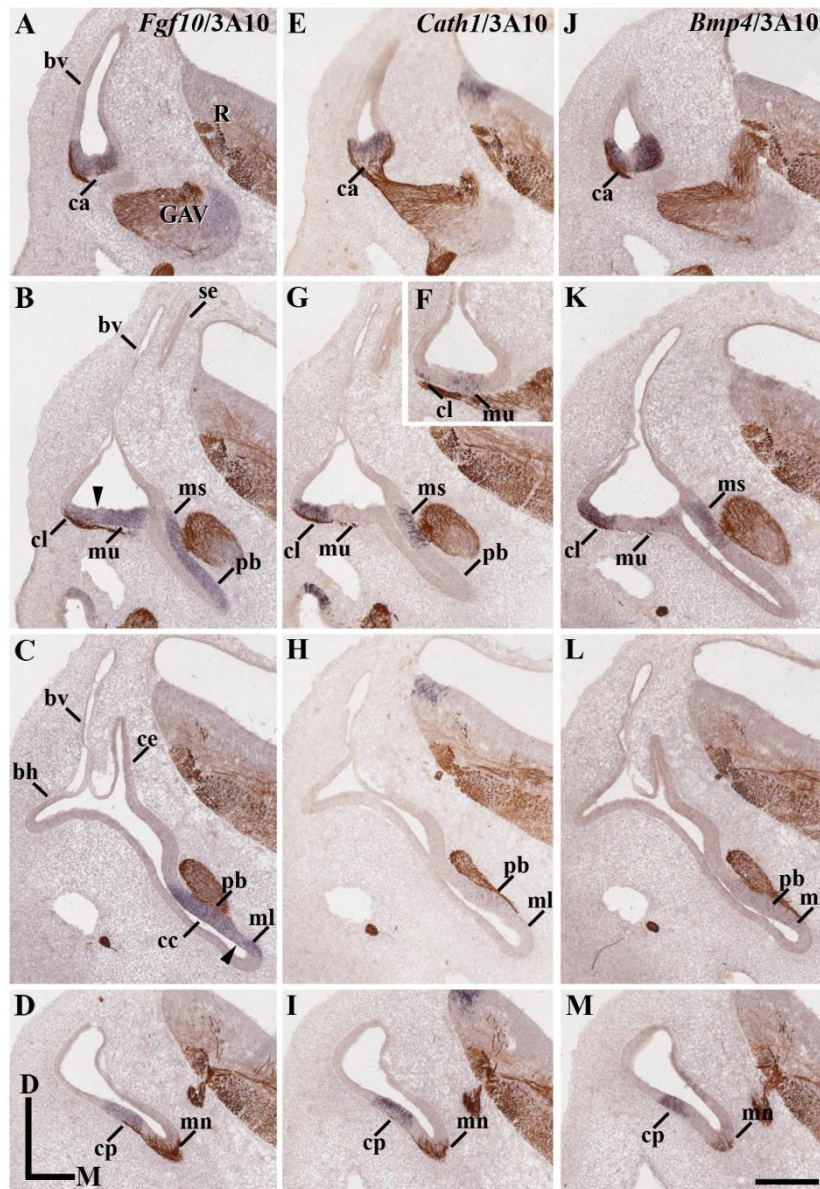
Con respecto a la expresión de *Bmp4*, elevados niveles de *Bmp4* se han observado en todas las crestas y la mácula del sáculo (ca, cl, cp, ms; Fig. 17J,K,M), mientras que solamente una débil expresión se observa en la mácula del utrículo, papila basilar y mácula de la lagena (mu, pb, ml; Fig. 17K,L). Por lo tanto, podríamos considerar que, durante el desarrollo del oído interno, la expresión de *Fgf10* es mejor marcador de los elementos sensoriales que la expresión de *Bmp4*.

Células que expresan *Cath1* están presentes en todas las crestas (Fig. 17E,G,I), en un reducido área de la mácula del utrículo (mu; Fig. 17F,G) y en toda la mácula del sáculo (ms; Fig. 17G). La papila basilar muestra un bajo número de células que expresan *Cath1* (no mostrado). La expresión de *Cath1* es negativa para la mácula de la lagena (ml; Fig. 17H) y la mácula neglecta (mn; Fig. 17I). La localización de algunas de las células que expresan *Cath1* se restringe a algunos, pero no todos, los elementos sensoriales.

La Figura 17N y O resumen los patrones de expresión de *Fgf10* y *Cath1* en el oído interno de estadio HH27. Todos los epitelios sensoriales están completamente marcados por la expresión de *Fgf10*, excepto la mácula neglecta que lo está parcialmente. La separación entre la cresta lateral y la mácula del utrículo, por un lado, y la papila basilar y la mácula de la lagena, por otro lado, presentan una débil expresión de *Fgf10* (cabezas de flecha en Fig. 17N). La mácula del sáculo y la papila basilar están aun incluidas en una banda continua dorso-medial de expresión de *Fgf10*. Por otro lado, la banda dorso-medial de expresión de *Bmp4* se localiza en la porción caudal del oído interno de estadio HH27, la cual se extiende desde la mácula neglecta a la mácula de la lagena (flecha en Fig. 17O), estando ausente para la expresión de *Fgf10* y cualquier otro marcador de células ciliadas diferenciadas, en particular *Cath1*.

-----►

Figura17. Patrones de expresión de *Fgf10*, *Cath1* y *Bmp4* en el estadio HH27. Secciones transversales. Las sondas que han sido usadas están anotadas en cada columna. Todas las secciones están tratadas con el anticuerpo 3A10. **(A-D)** La expresión de *Fgf10* se observa en todos los elementos sensoriales, siendo menos evidente en la mácula neglecta (mn; D). Las cabezas de flecha en B y C señalan las áreas con baja expresión de *Fgf10*. **(E-G)** Las células que expresan *Cath1* se detectan en las crestas (ca, cl y cp; E,G,I), la mácula del utrículo (mu; F,G) y la mácula del sáculo (ms; G). **(J-M)** Diferentes niveles de expresión de *Bmp4* se observan en muchos territorios sensoriales. Esquemas tridimensionales de la visión anterior **(N)** y posterior **(O)** del oído interno de estadio HH27 que resumen los patrones de expresión de *Fgf10* y *Cath1*. La débil e intensa expresión de *Bmp4* es también distinguida. La débil expresión de *Fgf10* es indicada (cabezas de flecha). En el conducto coclear, el dominio abneural de expresión de *Bmp4* no presenta expresión de expresión de *Fgf10* y *Cath1*. Orientación: C, caudal; D, dorsal; M, medial; R, rostral. La barra de aumentos en M indica 60 µm (aplicado en A-M).

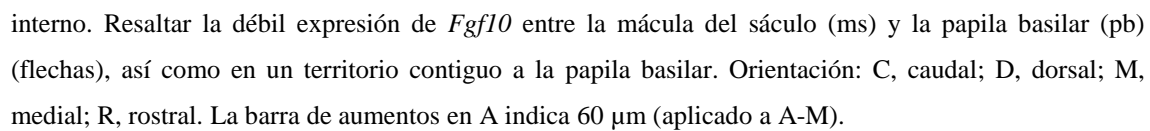


5.5. Expresión de *Fgf10* en el estadio HH34

Al octavo día de incubación (E8; HH34), el laberinto membranoso de pollo ha alcanzado su forma madura y su regionalización definitiva. Todos los epitelios sensoriales pueden ser identificados histológicamente y morfológicamente. La expresión intensa de *Fgf10* se detecta en todos los elementos sensoriales del oído interno de pollo (Fig. 18A-E), los cuales están inervados por las dendritas de las neuronas del ganglio acústico-vestibular (Fig. 18A-E). Resultados similares se han obtenido con otros marcadores, tales como *Serrate1*, *Cath1*, y *Hes5* (para la mu, ms, y pb, ver Fig. 18F-J). Un área entre la unión sáculo-coclear, contigua a la mácula del sáculo, expresa débilmente *Fgf10* (flechas en Fig. 18A,C) y fuerte expresión de *Serrate1* (flecha en 18F), pero es negativa para *Cath1* (Fig. 18G). Este área de baja expresión de *Fgf10* se extiende ventralmente por el epitelio del conducto coclear proximal (cc; flecha en Fig. 18A), donde contacta con la fuerte expresión de *Fgf10* en la papila basilar (ver flecha en Fig. 18D). En el conducto coclear, el dominio de expresión débil forma una banda no sensorial *Fgf10* positiva a lo largo del borde neural anterior de la papila basilar. Esta región no presenta expresión de *Cath1* (Fig. 18H), ni para *Hes5* (Fig. 18I) ni *Serrate1* (Fig. 18J). Este área de baja expresión de *Fgf10* se extiende hacia el dominio presuntivo del *tegmentum vasculosum* (tv; Fig. 18D), el cual esta definido específicamente por la expresión de *Otx2* (tv; Fig. 18K; Sánchez-Calderón *et al.*, 2004; comparar cabezas de flecha en Fig. 18D,K). Por lo tanto, en estadio HH34, todos los elementos sensoriales del epitelio ótico están definidos por una fuerte expresión de *Fgf10* y las fibras óticas marcadas con el anticuerpo 3A10. Sin embargo, la mácula del sáculo y la papila basilar están incluidas en una gran banda dorso-ventral marcada por la expresión de *Fgf10*. La Figura 18L y M resumen la expresión de *Fgf10* en el oído interno de estadio HH34.

-----►

Figura18. Patrón de expresión de *Fgf10* en estadio HH34. Secciones horizontales tratadas con las sondas indicadas y el anticuerpo 3A10. (A-K) La expresión de *Fgf10* es detectada en todos los elementos sensoriales (A-E), los cuales están claramente definidos por el anticuerpo 3A10, también marcados por la expresión de *Serrate1* (F,J), *Cath1* (G,H) y *Hes5* (I). Notar que existe un territorio no sensorial, *Fgf10* positivas, entre la mácula del sáculo y la papila basilar (ms y pb; flechas en A,C), estando marcado también por *Serrate1* (flecha en F) y no por *Cath1* (flecha en G). En el conducto coclear, el dominio de expresión de *Fgf10* es más grande que el área inervada de la papila basilar (pb; flecha en D; ver también flechas en H-J), colindando con la expresión de *Otx2* del *tegmentum vasculosum* (tv; cabezas de flecha en D,K). (L,M) Diagramas en 3D que resumen el patrón de expresión de *Fgf10* en estadio HH34 del oído



DISCUSIÓN

1. Regionalización del epitelio ótico

Durante el desarrollo del oído interno, los tipos celulares surgen en una correcta relación espacial unos respecto de los otros. Esto podría ser simplificado si el epitelio ótico estuviera segregado en diferentes compartimentos desde estadios tempranos. Este mecanismo de regionalización ocurre en otros sistemas, tales como en los apéndices de las moscas y el rombencéfalo de vertebrados, donde se forman compartimentos que son esenciales para la identidad regional y la especificación del destino celular (Meinhardt, 1983a; Puelles *et al.*, 2007). Este proceso estaría controlado por la expresión asimétrica de determinados genes reguladores, principalmente factores de transcripción, los cuales definirían áreas de restricción clonal dentro del epitelio ótico en desarrollo (Fekete y Wu, 2002). Una vez definidos estos compartimentos, el consecuente enfrentamiento entre poblaciones celulares adyacentes, con claras diferencias moleculares y genéticas, sería responsable de la síntesis de señales difusibles (morfógenos) desde los bordes de esos dominios celulares hacia las células colindantes (Meinhardt, 2008). Por lo tanto, la expresión asimétrica de determinados genes son las responsables de la regionalización inicial del epitelio ótico y posterior diferenciación celular.

Tras la inducción ótica, cuando la placoda ótica se invagina para formar la vesícula ótica, el patrón de expresión de los genes reguladores en el epitelio ótico se está estableciendo. Los mecanismos de señalización desde el rombencéfalo están directamente implicados en la especificación de los ejes dorso-ventral y/o latero-medial del esbozo ótico, mientras que señales desde el mesodermo subyacente y la notocorda, e incluso de los arcos faríngeos, pueden determinar la especificación del eje rostro-caudal (Riccomagno *et al.*, 2005; Bok *et al.*, 2007, 2011; Hammond y Whitfield, 2011; Groves y Fekete, 2012). De esta manera, el epitelio de la copa ótica, y consecuentemente el de la vesícula, se podría regionalizar por la acción de estas señales externas al esbozo ótico (Fig. 9). Sería interesante conocer cuáles podrían ser estos compartimentos en el epitelio ótico.

Nuestros trabajos descriptivos sobre los patrones de expresión de posibles genes reguladores nos han permitido dividir el epitelio de la vesícula ótica en cuatro porciones o dominios moleculares. El gen *Raldh3*, que codifica para la enzima encargada de la síntesis del ácido retinoico (AR), se empieza a expresar en el estadio de vesícula ótica, probablemente inducido por señales difusibles provenientes del rombencéfalo. La pared



dorso-medial del esbozo ótico, lugar en el que se desarrollará el sistema endolinfático, en particular su porción más dorsal, empieza a expresar este gen. El borde lateral y ventral del dominio *Raldh3* en el estadio HH18 coincide con el límite medial y dorsal del dominio *Meis2* y *Fgf10*, respectivamente, delimitando por un lado, el dominio dorso-lateral *Meis2* positivo y el dominio ventro-medial *Fgf10* positivo (ver más adelante). Se podría plantear la hipótesis que el AR endógeno podría ser necesario, y quizá suficiente, para la morfogénesis y regionalización del oído interno, proporcionando información posicional y controlando la expresión de genes reguladores dianas involucrados en concretar los ejes dorso-ventral y latero-medial del esbozo ótico.

Miembros de la familia de los genes *Otx* están implicados en el establecimiento del patrón interno de varias estructuras embrionarias (Simeone *et al.*, 2002; Hidalgo-Sánchez *et al.*, 2005). Se ha descrito que *Otx1/2* se expresan en el desarrollo del oído interno de vertebrados, observándose la expresión de *Otx2* en la pared ventro-medial del epitelio ótico de pollo, correspondiente al territorio presuntivo del *tegmentum vasculosum* (Sánchez-Calderón *et al.*, 2002, 2004). Ratones mutantes de *Otx* muestran alteraciones de la cóclea (Morsli *et al.*, 1998; Cantos *et al.*, 2000), por lo que puede estar implicado en la especificación del conducto coclear. La expresión de *Otx2* podría estar controlada por el AR. En el desarrollo del sistema nervioso, el AR determina la localización inicial del territorio que expresa *Otx2* durante la gastrulación, reprimiendo a *Otx2* (Ang *et al.*, 1994; Avantaggiato *et al.*, 1996; Li y Joyner, 2001). En el desarrollo del oído interno, otras vías de señalización (tales como FGF, SHH y BMP) podrían definir la localización del *Otx2* en estadios de desarrollo temprano.

Recientemente fue mostrado que el AR de los somitas inhibe las vías de señalización de los FGFs en el epitelio del tubo neural (Diez-del-Corral *et al.*, 2003; Novitch *et al.*, 2003; Wilson y Maden, 2005). Esta inhibición ha sido confirmada en el desarrollo del telencéfalo (Marklund *et al.*, 2004). Todo ello sugiere que el AR, generado en el epitelio ótico dorso-medial, puede difundir y regular algunas señales del epitelio ótico, afectando a la especificación de los elementos sensoriales adyacentes probablemente por efecto dependiente de la dosis.

Por otro lado, también se ha visto que los genes *Meis* modulan diferentes fenotipos telencefálicos al controlar las señales de AR y FGF (Marklund *et al.*, 2004). Se sabe que los genes *Meis* son importantes dianas del AR y que cooperan en el patrón

de varias estructuras durante el desarrollo. Los genes *Meis* está implicados en el establecimiento del patrón próximo-distal de las extremidades de vertebrados mediante el control del AR (Mercader *et al.*, 2000, 2005; Qin *et al.*, 2002; Yashiro *et al.*, 2004). Nuestros trabajos han mostrado que los genes *Meis* se expresan en la porción dorso-lateral del esbozo ótico, un territorio implicado principalmente en la formación de los canales semicirculares, y posiblemente de sus elementos sensoriales asociados, las crestas. En el cerebro posterior de *Xenopus*, *Xmeis3* y el AR parecen estar significativamente implicados en la regionalización antero-posterior (Dibner *et al.*, 2004). Por lo tanto, los genes *Meis* y la vía de señalización del AR pueden actuar conjuntamente para determinar la información posicional a lo largo de los ejes morfogénicos del esbozo del oído interno. Así, el AR podría portarse como un morfógeno, probablemente controlando el desarrollo del sistema endolinfático y de los canales semicirculares, además de la especificación del epitelio sensorial (Romand *et al.*, 2006b; Sánchez-Guardado *et al.*, 2009). De esta manera, el grado de distribución del AR puede tener un largo rango de difusión desde la expresión de *Raldh3* en la región ótica dorso-medial, pudiendo ser el responsable de la cooperación dosis-dependiente de MEIS y AR.

Es interesante notar que la expresión de *Meis2* precede a la de *Raldh3* (Sánchez-Guardado *et al.*, 2009, 2011a). La señal del AR probablemente mantiene, pero no induce, la expresión de *Meis2* en los estadios tempranos del desarrollo. Las interacciones de AR y *Meis2* pueden ser particularmente relevantes en estadios posteriores, cuando la especificación de los sitios sensorial y no sensorial tienen lugar, siendo menos importante durante el periodo de inducción ótica. Así, *Meis2* podría tener dos papeles diferentes durante el desarrollo del oído interno: uno en los eventos tempranos morfogénicos y otro en la posterior especificación del epitelio otico.

Desde hace un tiempo, se viene considerando al gen *Fgf10* como un excelente marcador de las zonas sensoriales (ver más adelante), marcando el epitelio pro-neural desde estadios tempranos del desarrollo otico (Alsina *et al.*, 2004; Abelló y Alsina, 2007, Sánchez-Guardado *et al.*, 2012). Por lo tanto, según los resultados obtenidos de estos patrones de expresión de los genes *Fgf10*, *Meis2* y el AR, podríamos postular que estas señales se están reprimiendo/activando mutuamente para determinar la precisa localización de al menos el epitelio sensorial vestibular. El epitelio sensorial auditivo



podría estar determinado por la interacción de los genes *Fgf10*, *Otx2* y el AR, sin olvidar el efecto de SHH desde la notocorda. Más estudios son necesarios para entender mejor las interacciones de MEIS, AR, OTX2 y FGF, y sus implicaciones en el patrón que controla el desarrollo normal del epitelio otico.

2. Un nuevo planteamiento sobre los compartimentos de epitelio ótico

Los grupos de investigación de las Dras. Donna M. Fekete y Doris Wu propusieron un modelo de desarrollo para el oído interno de vertebrados, en especial de aves y mamíferos, por el cual el epitelio ótico estaría subdividido en varios compartimentos. Los bordes de estos dominios, definidos por la expresión de genes reguladores y determinados a su vez por la acción de señales procedentes de los tejidos cercanos, proporcionarían señales posicionales. Las interacciones o intersecciones entre estos territorios definirían los lugares del epitelio en el cual se especificarían los diferentes elementos sensoriales del oído interno de vertebrados (Fekete, 1996; Brigande *et al.*, 2000a,b; Fekete y Wu, 2002). No obstante, esta hipótesis no se ha podido confirmar definitivamente por la ausencia de estudios exhaustivos de la expresión combinada de genes claves, así como un estudio comparado entre diferentes grupos de vertebrados, sobre todo entre aves y mamíferos.

Nuestros trabajos se han centrado en la búsqueda de genes que regionalicen el epitelio ótico en desarrollo, implicados sobre todo en la especificación de los distintos ejes del esbozo ótico: dorso-ventral, latero-medial y antero-posterior. De entre todos los genes analizados, cuatro de ellos han sido importantes en estos estudios: *Raldh3* (Sánchez-Guardado *et al.*, 2009), *Meis2* (Sánchez-Guardado *et al.*, 2011a), *Fgf10* (Sánchez-Guardado *et al.*, 2012) y *Otx2*, este último descrito en detalle previamente (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). Como casi todos los genes analizados en el desarrollo del oído interno de vertebrados, estos presentan patrones de expresión muy dinámicos. Los cambios en los límites de expresión de estos genes dificulta la confirmación de la existencia de compartimentos estancos durante el desarrollo del epitelio ótico. Sin embargo, en el estadio de vesícula ótica tardía (HH22-24), los dominios de expresión de los genes *Raldh3*, *Meis2*, *Fgf10* y *Otx2* se enfrentan los unos a los otros, sin solapamientos y sin dejar ningún hueco de expresión entre ellos. En este estadio, ni antes ni después, se confirma la hipótesis de los compartimentos propuestos por Fekete y Wu (2002): (1) *Meis2* definiría un compartimento implicado en la formación de los

canales semicirculares, y quizá directa o indirectamente en la especificación de las crestas; (2) *Raldh3* marcaría el territorio presuntivo del sistema endolinfático y su inserción en el vestíbulo; (3) *Fgf10* definiría un compartimento sensorial, que incluiría a los elementos sensoriales fundamentales o básicos del oído interno de vertebrados, excepto la cresta lateral y la mácula neglecta, evolutivamente de reciente aparición (ver más adelante); (4) mientras que *Otx2* estaría implicado en el desarrollo del conducto coclear, en concreto del *tegmentum vaculosum*, la estría vascularis de mamíferos.

Estos resultados nos llevan a plantear otro modelo para explicar el desarrollo del oído interno de los vertebrados. Se podrían definir cuatro etapas en la embriogénesis de este órgano sensorial. La primera de ellas atañe al proceso de inducción de la placoda ótica en el ectodermo cefálico. Una vez determinada la competencia de este territorio placodal, y quizá con ello la especificación del eje antero-posterior del futuro esbozo ótico, vendría una segunda etapa en la que se dan los cambios morfogenéticos que llevan a la formación de la copa ótica y la vesícula ótica, así como la posible especificación de los ejes dorso-ventral y latero-medial. Este periodo terminaría con el cierre del poro ótico, formándose una estructura casi esférica independiente del ectodermo cefálico del que se origina. Desde este estadio, HH16-17, la vesícula ótica estaría sometida a la acción de señales difusibles procedentes de los tejidos próximos, que determinaría una regionalización completa del epitelio ótico, momento en el cual se podría considerar la hipótesis de los compartimentos claramente definidos (HH24). Una vez que el esbozo ótico se ha regionalizado correctamente en cuatro porciones (dorso-medial, dorso-lateral, ventro-medial y ventro-lateral), empezaría una cuarta etapa en la que se produciría la especificación completa de todos los elementos sensoriales y no sensoriales del oído interno, junto con todos los cambios morfogenéticos que le acompaña. Entre ellos, destacar la formación del sistema endolinfático, los canales semicirculares, la subdivisión del territorio pan-sensorial *Fgf10* positivo, con las adquisición de nuevas propiedades adaptativas, y el desarrollo del conducto coclear asociado a la audición como percepción sensorial más tardía en la evolución del oído interno de vertebrados. Estudios de nuevos patrones de expresión y trabajos experimentales serían necesarios para confirmar este nuevo planteamiento.



3. Especificación de los elementos sensoriales: la expresión del gen *Fgf10*

El desarrollo de los elementos sensoriales del oído interno es una recapitulación de su historia evolutiva. Estudios histológicos del oído interno de diferentes vertebrados han sugerido que el primordio sensorial podría localizarse en la pared ventro-medial del otocisto, de donde se piensa que se forman todos los elementos sensoriales (Knowlton, 1967). Recientes datos moleculares apoyan la hipótesis de que la evolución de un epitelio sensorial múltiple sucedió a través de subdivisiones sucesivas de un epitelio sensorial único y sencillo (dominio pan-sensorial; Fig. 19A), ya existente en el oído interno de un vertebrado ancestral, adquiriéndose así nuevas adaptaciones evolutivas (Fritzsche y Beisel, 2001). De esta manera, durante la evolución, el oído interno de los vertebrados ha pasado de tener dos crestas y una única mácula central, perteneciente a *Mixines* (Fig. 19B), a una estructura tridimensional compleja que puede albergar desde seis elementos sensoriales, característico de peces (Fig. 19C), hasta ocho elementos sensoriales en el caso de aves (Fig. 19D) y nueve órganos sensoriales distintos en ciertas especies de anfibios (Fritzsche y Wake, 1988; Fritzsche y Beisel, 2001). Además, existe otra hipótesis que sugiere la adquisición de nuevos elementos sensoriales del oído interno por una nueva creación, *de novo* (Wu and Oh, 1996; Bang *et al.*, 2001; Bever y Fekete, 2002; Hammond y Whitfield, 2006). Así, la segregación desde un territorio original y la creación de nuevos elementos sensoriales son consideradas las dos tendencias evolutivas en el desarrollo filogenético del oído interno de vertebrados.

Ha sido propuesto que la expresión de *Fgf10* podría estar implicada en promover la morfogénesis durante el desarrollo del oído interno de aves y mamíferos (Pirvola *et al.*, 2000; Pauley *et al.*, 2003; Alsina *et al.*, 2004; Ohuchi *et al.*, 2005; Abelló y Alsina, 2007). En la placoda ótica de aves, la expresión de *Fgf10* se detecta en su porción más antero-medial. Este dominio *Fgf10* positivo cambia durante la formación de la vesícula ótica, formando una banda bien definida situada en la porción ventro-medial del esbozo ótico. Así, *Fgf10* define un dominio presuntivo neuro-sensorial que anticipa la expresión de varios genes pro-neurales y neurogenéticos, tales como *Ngn1*, *Delta1*, *Hes5* y *NeuroD/M* (Alsina *et al.*, 2004; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012).

Nuestros resultados muestran claramente la hipótesis de una implicación de *Fgf10* en la especificación de los elementos sensoriales durante el desarrollo del oído interno de aves. El dominio pan-sensorial descrito por Knowlton (1967) quedaría

definido por la expresión del gen *Fgf10* (Sánchez-Guardado *et al.*, 2012). El dominio de expresión del *Fgf10* en la vesícula ótica delimita un territorio sensorial competente, incluido completamente en un área mayor de expresión de *Serrate1*. Este dominio *Fgf10* positivo no incluye a los territorios presuntivos de todos los elementos sensoriales. La cresta anterior y posterior, las máculas del utrículo, del sáculo y de la lagena, así como la papila basilar, se diferencian dentro de él, mientras que la cresta lateral y la mácula neglecta están excluidas de este dominio común, adquiriendo la expresión *Fgf10* cuando estos elementos sensoriales se diferencian posteriormente en el desarrollo. Se podría sugerir que estos dos elementos sensoriales se generan *de novo* en áreas adyacentes (compartimentos) al dominio inicial *Fgf10* positivo, y que su especificación podría estar mediada por señales locales aun desconocidas, incluyendo posiblemente a los genes *Serrate1* y *Bmp4*, entre otros. Estos resultados, junto con la expresión de marcadores de células ciliadas, en particular *Cath1*, nos permite determinar el momento de la especificación de cada elemento sensorial (Sánchez-Guardado *et al.*, 2012). Por lo tanto, nuestros trabajos descriptivo de la expresión del gen *Fgf10* en el desarrollo del oído interno de aves, considerado como un buen modelo en estudios experimentales, confirman la existencia de estas dos directrices evolutivas (Fig. 19; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012).

4. Aspectos moleculares y evolutivos del oído interno de vertebrados

En etapas iniciales del desarrollo embrionario, hemos observado que la expresión del gen *Raldh3* delimita dorsalmente la banda continua antero-posterior de expresión del gen *Fgf10* (Sánchez-Guardado *et al.*, 2009, 2012). Por ello, la interacción entre el AR y FGF10 podría provocar la inhibición de la expresión de *Fgf10* por el AR, induciendo la consiguiente subdivisión del territorio pan-sensorial *Fgf10* positivo observado en la vesícula ótica (Fig. 19A). De esta manera, se generan nuevos elementos sensoriales, con nuevas adquisiciones evolutivas. Así, la interacción entre el AR y *Fgf10* puede definir la aparición y disposición final de los diferentes elementos sensoriales en el complejo laberinto membranoso (Fig. 19D). Además, esta hipótesis está apoyada por el hecho de que el exceso o déficit de AR en el esbozo ótico genera perturbaciones en su morfogénesis y organogénesis, posiblemente por la alteración de la vía del *Fgf10* (Liu *et al.*, 2008; Frenz y Frenz, 2010). Esta subdivisión reproduce la segregación y aparición de los diferentes elementos sensoriales durante la evolución del



oído interno de vertebrados (Fig. 19). Más estudios experimentales serían necesarios, orientados al bloqueo de algunas de estas vías de señalización, AR *versus* FGF.

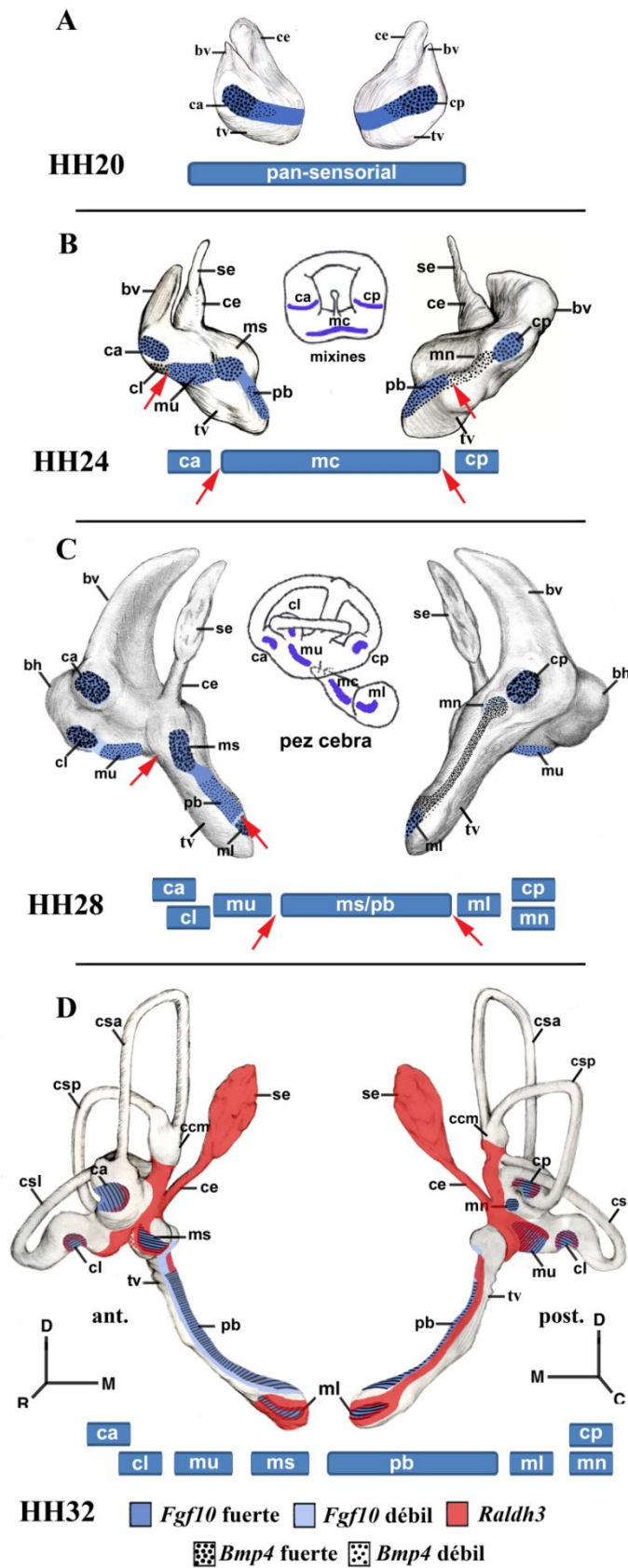


Figura 19. Esquemas de la visión anterior (izquierda) y visión posterior (derecha) del oído interno durante su desarrollo en los estadios HH20 (A), HH24 (B), HH28 (C) y HH32 (D). La expresión de *Fgf10* se representa de color azul en los distintos esquemas. (A) La expresión de *Fgf10* forma una banda continua que incluye la región pan-sensorial del epitelio ótico, representada a su vez mediante una barra azul debajo de los esquemas. (B) La banda continua de *Fgf10* se fragmenta dando a dos crestas (anterior y posterior) y una gran mácula común. Las flechas rojas representan la zona donde se ha fragmentado dicha banda. En este momento del desarrollo el oído interno es semejante al de mixinos (agnatos), uno de los vertebrados más simples. (C) La mácula del sáculo y la mácula de la lagena se disgregan de la gran mácula común central como elementos sensoriales independientes (ver flechas rojas). En este estadio del desarrollo embrionario, la cresta lateral y la mácula neglecta se reconocen con claridad por diferentes niveles de expresión del gen *Fgf10*. El oído en estadio HH28 es similar al oído de los peces gnatostomados. (D) Finalmente, la mácula del sáculo y la papila basilar se separan, aunque están unidas por una baja expresión de *Fgf10*. En el esquema del oído también se representa la expresión de *Raldh3* (Sánchez-Guardado *et al.*, 2009), resaltando la importancia del AR en la forma y disposición de los diferentes elementos sensoriales en el oído interno. Esquemas con la expresión de *Raldh3* y *Fgf10* fueron tomados de Sánchez-Guardado *et al.* (2009) y Sánchez-Guardado *et al.* ((2012).

CONCLUSIONES

Tras el estudio comparado de la expresión dinámica de los genes *Meis2*, *Raldh3*, *Otx2* y *Fgf10* en diferentes etapas del desarrollo del oído interno de aves, con una posible función en la generación de compartimentos en el epitelio ótico, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

PRIMERA - La localización de la expresión del gen *Meis2*, restringida a la pared dorso-lateral del epitelio ótico, sugiere que *Meis2* podría delimitar un dominio dorso-lateral en el epitelio ótico en desarrollo. El gen *Meis2* podría estar implicado directamente en la especificación de los canales semicirculares, y probablemente de los elementos sensoriales asociados.

SEGUNDA – La disposición de la expresión del gen *Raldh3*, restringida a la pared dorso-medial del epitelio ótico y dorsal a algunos territorios presuntivos sensoriales, sugiere que *Raldh3* podría delimitar un dominio dorso-medial en el epitelio ótico en desarrollo, donde se origina el sistema endolinfático.

TERCERA – La localización de la expresión de *Otx2*, limitada a pared ventro-lateral del esbozo ótico, podría estar estableciendo un dominio ventro-lateral en el epitelio ótico en desarrollo.

CUARTA – La expresión de *Fgf10* en el territorio ventro-medial del esbozo ótico, Este dominio ventro-medial, *Fgf10* positivo, estaría definiendo el compartimento pan-sensorial, el cual se va a ir segregando progresivamente, dando los diferentes elementos sensoriales. No obstante, la cresta lateral y la mácula neglecta se originarían *de novo* en la proximidad de este territorio pan-sensorial.

QUINTA – La interacción de los cuatro genes estudiados puede estar implicada en el destino sensorial/no sensorial del epitelio ótico durante su desarrollo. La interacción recíproca entre el AR/FGF podría regular la adquisición sensorial apropiada, con nuevas capacidades adaptativas.

CAPÍTULO 2

MAPA DE DESTINO DE LA PLACODA ÓTICA DE AVES

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del oído interno se lleva estudiando desde más de un siglo. Sin embargo, hoy en día se conoce relativamente poco acerca de dónde surge cada una de las estructuras sensoriales/no sensoriales del oído interno adulto en la propia placoda, e incluso sobre la relación espacial que existe entre el origen de los diferentes linajes celulares que componen el oído interno completamente diferenciado (Kill y Collazo, 2002). Una aproximación la proporcionan los estudios de especificación genética, es decir, la especificación del epitelio ótico que ocurre a través de la expresión asimétrica de diversos genes reguladores (ver Capítulo 1; Brigande *et al.*, 2000b; Fekete y Wu, 2002). Hay que tener en cuenta que los patrones de expresión no son mapas de destino, ya que la expresión de un gen puede activarse o desactivarse durante el desarrollo, convirtiéndolos en una etiqueta de destino poco fiable. La mejor manera para entender la diferenciación del epitelio ótico, e incluso la evolución del oído interno, es mediante la realización de un mapa de destino. Así, un mapa de destino permite estudiar el desarrollo de una determinada estructura en diferentes etapas del proceso ontogenético, e incluso la evolución, ya que la ontogenia recapitula a la filogenia. De esta manera, un mapa de destino de la placoda ótica proporcionaría un esquema gráfico, donde se representaría el destino de múltiples células o regiones durante el desarrollo embrionario, además de mostrar la relación espacial de cada una de sus partes, en un contexto de cambios morfogenéticos y evolución (Chalmers y Slack, 2000).

Se han realizado pocos mapas de destino en el desarrollo del oído interno. Concretamente, se han utilizado para ello cuatro especies de vertebrados, usados ampliamente como modelos de estudios descriptivos y experimentales, y que acogen a su vez a varios grupos filogenéticos: (1) el pez *Danio rerio*, un pez teleosteo (Kozłowski *et al.*, 1997); (2) la rana *Xenopus laevis*, un anfibio anuro (Kill y Collazo, 2001; Pieper *et al.*, 2011); y dos amniotas: (3) el pollo, *Gallus gallus* (Brigande *et al.*, 2000a; Streit, 2002; Abelló *et al.*, 2007; Bell *et al.*, 2008) y (4) el ratón, *Mus musculus* (Li *et al.*, 1978).

1. Mapas de destino en estadios previos a la formación de la placoda ótica

El mapa de destino del **pez cebra**, *Danio rerio*, se realizó en estadio temprano de gástrula, anterior a cualquier indicador morfológico o marcador molecular del territorio prospectivo para la placoda ótica. Para ello, se usaron embriones de una célula a los que se les inyectó un dextran fluoresceína. La fluorescencia de la zona de interés



se activó con un haz de luz ultravioleta durante 2-4 segundos, marcando un pequeño grupo de células (5-25 células). Kozlowski y colaboradores (1997) identificaron un amplio territorio ventro-medial que daba células del otocisto, entre otras placodas, y tejidos del ectodermo. No consiguieron marcar ninguna zona que diera exclusivamente a la vesícula ótica. Esto puede ser debido a la amplia zona que se marca; aunque el número de células que marcaban parecería en principio pequeño, el número de células que van a constituir el otocisto probablemente sea aún más pequeño. Habría que marcar un número menor de células, por ejemplo una o dos, para ver si el territorio de la placoda ótica está ya separado o entremezclado con el resto de las placodas.

En embriones de *Xenopus*, Pieper y colaboradores (2011) llegaron a la misma conclusión, usando para ello tanto inyecciones de DiI como trasplantes en estadios anteriores al de placoda ótica. Vieron que todas las placodas se originaban de un territorio próximo a la placa neural, el territorio pan-placodal, y, que en estos estadios, las células que iban a dar a las diferentes placodas estarían entremezcladas; aun no existía un territorio determinado para cada placoda (ver Fig. 4, Introducción General).

Por otro lado, Streit realizó un mapa de destino del territorio presuntivo de la placoda ótica en embriones de **aves**, entre los estadios HH5 y HH7 (Streit, 2002). Inyectó DiI o DiO en pequeños territorios, etiquetando un número muy reducido de células, siendo analizados posteriormente en estadio HH10-15. Al igual que en los trabajos con el pez cebra, no consiguió marcar una zona que diera única y exclusivamente a la placoda ótica. Usando la técnica de *time-lapse*, Streit vio que importantes movimientos celulares ocurrían incluso en estadios posteriores al de placoda ótica (Streit, 2002).

2. Mapa de destino en los estadios de placoda y vesícula ótica

1.1. Mapa de destino en Rana (*Xenopus*)

Usando inyecciones de DiD, Kil y Collazo (2001) observaron que los elementos sensoriales del oído interno surgen de cualquier región de la placoda ótica o el otocisto. Dividieron la placoda ótica en cuatro cuadrantes. Vieron que el cuadrante posterior era el que con más probabilidad daría lugar a los elementos no sensoriales, mientras que la parte anterior daría a los elementos sensoriales anteriores, pero nunca a los posteriores. Inyecciones en la porción dorsal dieron lugar tanto a elementos sensoriales anteriores

como posteriores, mientras que la porción ventral daría lugar a la cresta anterior y posterior.

1.2. Mapa de destino en aves (*Gallus gallus*)

Brigande y colaboradores (2000a) realizaron un mapa de destino usando inyecciones de DiI en embriones en el estadio de copa ótica, dividiendo el borde superior de la copa ótica en 12 regiones (ordenadas según la esfera del reloj). Con ello, propusieron dos límites de restricción en el polo dorsal del otocisto: un límite antero-posterior y un límite latero-medial. Pero la parte ventral de la copa ótica quedó sin ser analizada.

Por otro lado, Abelló y colaboradores (2007), usando inyecciones de DiI y DiO y los mismos estadios de desarrollo que Brigande y colaboradores (2000a), analizaron la porción ventral de la placoda-copa ótica, así como la parte dorsal de la misma. Estos autores determinaron que las células del epitelio ótico presentan un patrón coherente y ordenado de expansión.

Bell y colaboradores (2008), usando también inyecciones de DiI y DiO en embriones de estadio HH10-17 y analizándolos en HH30-32, se centraron en analizar el origen y la disposición de los diferentes elementos sensoriales. Vieron que había tres momentos claves en el desarrollo neuro-sensorial del oído interno. Primero, se produce el solapamiento parcial de los precursores de los órganos de los sentidos y las neuronas que los van a inervar, dispuestos a lo largo del eje antero-posterior de la placoda ótica. Segundo, los progenitores neurales y las células sensoriales que van a inervar surgen en una estrecha relación. Finalmente, la delaminación de los neuroblastos que van a inervar a los diferentes órganos sensoriales ocurre de manera espacio-temporal. Concluyeron que el desarrollo de los diferentes órganos sensoriales y su correspondiente inervación depende de señales espaciales y temporales que son coordinadas en estadio de placoda ótica, de tal manera que existen olas de diferenciación que van desde regiones antero-laterales a regiones postero-mediales. Existiría una generación ordenada de los elementos sensoriales vestibulares y cocleares, así como de las neuronas que los inervan (Bell *et al.*, 2008).



1.3. Mapa de destino en ratón (*Mus musculus*)

Li y colaboradores (1978) realizaron un mapa de destino en el estadio de vesícula ótica de ratón, pero no marcaron las células sino que cultivaron explantes de otocisto. Este estudio podría ser considerado como un mapa de especificación, más que un mapa de destino (Chalmers y Slack, 2000), dado que utilizan marcadores génicos. Observaron que la mitad dorsal del otocisto daría lugar a los canales semicirculares y sus crestas asociadas, mientras que de la parte ventral surgirían las estructuras cocleares. Por otro lado, mostraron que de la porción anterior se formaría el canal semicircular anterior y parte del lateral, junto con sus crestas, además de las dos máculas, mientras que de la porción posterior surgiría el canal semicircular posterior y el resto del canal semicircular lateral, así como la cresta posterior (Li *et al.*, 1978).

3. Estudios de linaje celular

Para trazar el linaje celular y evaluar el potencial de desarrollo de una célula *in vivo* habitualmente se usan dos métodos. Uno de ellos es usar retrovirus que median la transferencia de genes, por ejemplo el gen β -galactosidasa (lacZ) de la bacteria *E. coli*, el cual se integra en el genoma de la célula progenitora y marca a toda la progenie (Sanes, 1994; Cepko *et al.*, 1995). La ventaja es que el pro-virus se integra en el genoma de la célula y, por lo tanto, no se diluye el marcaje. La desventaja es la inserción no selectiva del gen viral en ciertos tipos celulares, además de que no muestran ni el momento exacto ni el lugar de la infección (Fekete *et al.*, 1998; Lang y Fekete, 2001). Estos estudios con retrovirus demostraron que las células ciliadas y de soporte comparten un progenitor común, tanto en el órgano auditivo (Fekete *et al.*, 1998) como en las estructuras sensoriales vestibulares (Lang y Fekete, 2001).

El otro método es inyectar una molécula fluorescente a una única célula, *lysinated rhodamine dextran* (LRD), que solamente pasa a la progenie (Gimlich y Braum, 1986; Bronner-Fraser y Fraser, 1989; Collazo *et al.*, 1993). La ventaja es que se puede observar directamente el número, momento y posición de las células marcadas. La desventaja es que el marcaje fluorescente se va diluyendo durante el desarrollo y que la célula de interés no tenga fácil acceso.

4. Consideraciones generales sobre los mapa de destino

Al realizar estudios comparativos de estos trabajos parece, por lo tanto, que dan resultados contradictorios respecto al origen de todos los elementos sensoriales y no sensoriales, probablemente debido a la diferencia entre especies, el estadio en el que se ha realizado el mapa de destino o la metodología usada en cada estudio de mapa de destino (Kil y Collazo, 2002). Para un correcto estudio de mapa de destino, es necesario marcar células de manera estable y que solamente se trasmita a la progenie (Kil y Collazo, 2002).

Los embriones quimeras (Le Douarin, 1969) han proporcionado una excelente herramienta para estudiar la migración y el destino de las células a lo largo del desarrollo (revisado por Le Douarin, 2008). Desde los primeros trabajos en el desarrollo del sistema nervioso central (Alvarado-Mallart y Sotelo, 1984), los embriones quimeras se han usado de manera exitosa en un gran número de experimentos de mapas de destino dedicados al estudio de la segmentación del tubo neural (Martínez y Alvarado-Mallart, 1989; Tan y Le Douarin, 1991; Martínez *et al.*, 1992; Marín y Puelles, 1995; Millet *et al.*, 1996; Cambroner y Puelles, 2000; Cobos *et al.*, 2001; García-López *et al.*, 2004; Pombero y Martínez, 2009). La interpretación de los resultados de estos trasplantes homotópicos se realiza mediante el anticuerpo QCPN, que es específico para codorniz y detecta única y exclusivamente el núcleo de las células de codorniz (donante) en el embrión pollo (huésped). Este método experimental es tan poderoso que previene el problema de la dilución de los marcajes fluorescentes de las células a través del desarrollo, usados en la gran mayoría de los estudios de mapa de destino y linaje celular en el oído interno, así como la incertidumbre de qué células han sido infectadas por el retrovirus.

OBJETIVOS

En los últimos años, parte de algunos estudios que se han realizado con la intención de obtener un mapa de destino en el desarrollo del oído interno, los cuales presentan resultados distintos y nada concluyentes, e incluso, llegando a ser contradictorio en algunos casos. Por lo tanto, aún no se ha llevado a cabo un correcto mapa de destino, en el estadio de placoda ótica, en el que se determine la posición precisa (desde el punto de vista topológico) de las diferentes estructuras que van a conformar el oído interno adulto.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar el mapa de destino del oído interno durante el desarrollo embrionario, exactamente en estadio de placoda ótica. Para ello, hemos utilizado el modelo de embriones quimera pollo/codorniz (Le Douarin, 1969; Alvarado-Mallart, 1984). Hemos centrando nuestra atención en:

1. Conocer la correcta localización y extensión de la placoda ótica en estadio HH10 (10 somitas), justo antes de que comience a invaginarse.
2. Establecer la correcta posición de las diferentes estructuras que componen el oído interno de aves en la placoda ótica, especialmente los elementos sensoriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Trasplantes

Los embriones de pollo son ampliamente utilizados como modelo experimental en embriología/biología del desarrollo. Una de las principales ventajas es la accesibilidad del embrión para su manipulación *in ovo*.

El estudio experimental realizado en este capítulo, se ha llevado a cabo mediante la realización de la técnica de trasplantes pollo/codorniz. Dicha técnica nos permite seguir un específico grupo de células (el trasplante) a lo largo del desarrollo del embrión y determinar el destino prospectivo y localización del tejido trasplantado (Le Douarin, 1969; Alvarado-Mallart y Sotelo, 1984; Hidalgo-Sánchez *et al.*, 1999).

La interpretación de estos experimentos se basa en el supuesto de que los trasplantes entre estas dos especies son equivalentes a trasplantes entre especies iguales, ya que muestran:

- Casi perfecta adaptación de los tejidos de una especie en otra.
- Gran similitud entre las fases de desarrollo.
- Total ausencia de mecanismos de rechazo inmunológico durante todo el desarrollo y primeras etapas post-eclosión.

Se realizaron trasplantes homotópicos (del mismo territorio embrionario) e inter-específicos (entre especies diferentes) de la placoda ótica y una pequeña porción del tubo neural, tal y como fue descrito por Alvarado-Mallart y Sotelo (1984), pero con algunas adaptaciones. Se utilizaron los diferentes rombómeros, las subunidades segmentarias del cerebro posterior, y los límites entre ellos como referencia fiable y permanente. El tubo neural fue trasplantado para dar consistencia al trasplante, facilitando su correcta integración. A la hora de hacer los trasplantes, utilizamos la codorniz como donante y el pollo como huésped en todos los experimentos.

2. Material necesario para las operaciones

- Capilares de vidrio
- Aguja (bisturí)
- Solución 1: sacarosa al 10 % en PBS 0,1 M pH 7,4, suplementada con antibiótico (Ampicilina/Streptomycin) a una dilución 1/1.000.
- Solución 2: Solución 1 + tinta china proporción 1/10.



- Placa Petri con parafina y carbón para colocar sobre él los embriones de codorniz
- Pipetas Pasteur
- Lupa

3. Incubación de los huevos

Para esta técnica, se utilizaron embriones de pollo (*Gallus gallus*, variedad Leghorn blanco) y embriones de codorniz (*Coturnix coturnix*) procedentes de la Granja de Santa Isabel de Granada.

Los huevos fecundados, tanto de codorniz como de pollo, fueron incubados en un intervalo de temperatura que oscila entre los 37-38°C y con humedad relativa constante en una incubadora sin volteo, hasta que los embriones alcanzaron el estadio elegido para realizar el trasplante. Según Vaage (1969), el comienzo de engrosamiento de la placoda ótica, y por lo tanto su máxima extensión, se hacen visibles en el estadio HH10 temprano (9-10 somitas), según las tablas de Hamburger-Hamilton (1951). Por lo tanto, para poder obtener los embriones en dicho estadio, los huevos de pollo se incubaron durante 30-32 horas y los de codorniz 28-30 horas. Los huevos de codorniz siempre fueron incubados 2-3 horas menos que los de pollo, ya que el desarrollo de la codorniz es más rápido que el de pollo.

4. Preparación de los huevos para trasplantar

Todos los experimentos fueron realizados en condiciones de máxima limpieza. Antes de realizar las manipulaciones quirúrgicas, se limpiaron debidamente tanto los huevos de pollo como los de codorniz con etanol 70%, así como todo el material y mesa que utilizamos durante las operaciones.

El embrión de pollo siempre fue utilizado como embrión huésped, así que fueron operados *in ovo* a través de una ventana realizada en la cascara del huevo. Debido a que el embrión se desarrolla en contacto con la cascara, es necesario crear una cámara de aire que separe el embrión de la cascara antes de abrir dicha ventana. Esto se consigue haciendo un agujero en la cascara y extrayendo aproximadamente 3 ml de albumen con una jeringuilla de 10 ml, intentando no aspirar yema, ya que produciría la muerte del embrión.

Una vez abierta la ventana en la cascara del huevo, le añadimos unas gotas de la Solución 1 para hidratar al embrión y que no se seque durante el periodo de manipulación. Además, como dicha solución tiene antibiótico, vamos a prevenir posibles contaminaciones bacterianas y fúngicas. Seguidamente, le inyectamos la Solución 2 en la yema con un capilar, justamente por debajo del embrión. Esta inyección se realiza para obtener contraste del embrión dentro del huevo y poder distinguir/manipular el embrión bajo la lupa. Los embriones de codorniz, como se mencionó anteriormente, fueron usados como donantes. Estos embriones se sacaron fuera del huevo, para su mejor manipulación, y colocados en una placa Petri con fondo negro (parafina y carbón), donde fueron estirados con agujas entomológicas para conseguir una tensión que facilite su manipulación. La placa Petri, además, estaba llena de la Solución 1 para mantener en las condiciones más óptimas el embrión de codorniz.

Para realizar la disección de la porción que queríamos trasplantar, utilizamos agujas entomológicas pegadas a un soporte, en este caso un palillo, a modo de bisturí. El siguiente paso, tras la apertura de la ventana en la cascara y la inyección de tinta china, es abrir un poco la membrana vitelina para que nos permita acceder al embrión y manipularlo. A continuación, en el embrión de pollo (huésped), diseccionamos la zona de la placoda ótica que queremos trasplantar y la eliminamos. Luego, en el embrión de codorniz (donante), realizamos la misma operación y del mismo territorio, pero en este caso, sin descartar la porción de placoda ótica recortada. Dicho fragmento obtenido del embrión de codorniz fue transportado con un capilar al embrión de pollo, siendo colocado en el hueco realizado anteriormente en dicho embrión y reemplazando al territorio de la placoda ótica eliminado con anterioridad. Una vez realizada la operación, el huevo fue sellado con parafilm y cera dental. Tras el cierre del huevo, este se introdujo nuevamente a la incubadora en posición horizontal para continuar con el desarrollo embrionario. Al quinto día de incubación, contando desde el día de la operación, se procedió a la fijación de los embriones de la manera descrita en el Capítulo 1.

5. Regiones trasplantadas

En general, se trasplantaron diferentes áreas rectangulares del ectodermo cefálico enfrentado a los diferentes rombómeros. Los trasplantes fueron realizados en el



estadio HH10 (10 somitas). En estos estadios no ha comenzado aún el proceso de invaginación de la placoda ótica (Vaage, 1969).

La topografía y localización de los trasplantes se ha representado sobre un esquema de un embrión de ave de estadio HH10 (Fig. 20). La referencia tomada para la realización de los trasplantes del territorio del ectodermo cefálico fueron los distintos rombómeros del rombencéfalo. Se trasplantó el ectodermo que va desde el rombómero 3 al rombómero 8 (Fig. 20A).

Para analizar en detalle el destino del ectodermo que contiene a la placoda ótica, se realizaron tres tipos de trasplantes (Fig. 20B). Todos ellos tienen en común la línea medial del embrión (flechas rojas) y que llevan una porción de la placa alar del tubo neural. En el trasplante tipo 1, tomamos el tercio más dorsal del ectodermo cefálico (Td). El destino de la región trasplantada fue representado en un esquema tridimensional del oído interno de ave de seis días de incubación (estadio HH29; E6). En el tipo 2, tomamos los dos tercios más dorsales, que incluye también al territorio del trasplante tipo 1 (Fig. 20B). La extensión del trasplante tipo 2 en el epitelio ótico de un embrión de (E6) fue comparada con la del trasplante tipo 1. La diferencia en la extensión de los dos tipos de trasplantes (tipo 2 menos tipo 1) se originaría a partir del tercio intermedio (Ti) del ectodermo cefálico. Los trasplantes tipo 3 cogen el ectodermo cefálico entero, el cual incluye a los trasplantes tipo 1 y tipo 2 (Fig. 20B). En un embrión de estadio E6, la diferencia en la extensión de los trasplantes tipo 2 y tipo 3 se originaría a partir del tercio más ventral (Tv) del ectodermo cefálico trasplantado (Fig. 20B). Por lo tanto, se ha analizado el destino de tres tercios del ectodermo cefálico enfrentado a cada unidad segmentaria: **Td**, tercio más dorsal; **Ti**, tercio intermedio; y **Tv**, tercio más ventral (Fig. 20B). Estas tres porciones del ectodermo se representaron con diferentes intensidades de un mismo color; en el ejemplo de la Figura 20B fue el azul.

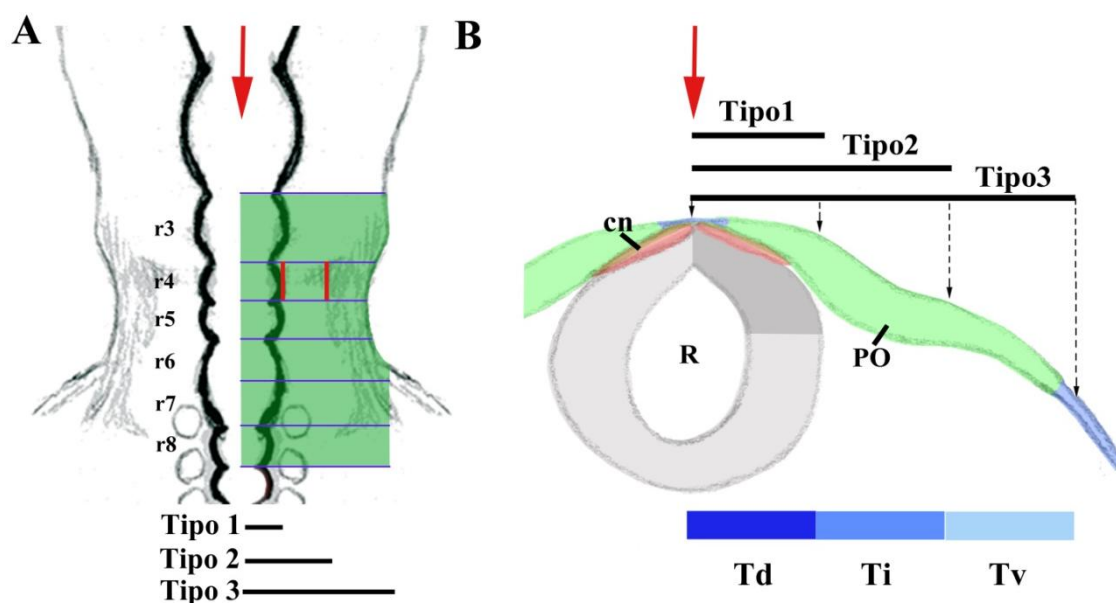


Figura 20. Esquemas de la placoda ótica de un embrión de estadio HH10. (A) Se representa en verde el área del ectodermo que se ha analizado. Las líneas azules horizontales representan las líneas de corte que se realizaron para trasplantar las porciones del ectodermo cefálico enfrentadas a cada rombómero (r3-r8). (B) Sección transversal a través del embrión de estadio 10 a nivel de la placoda ótica. Se representa la extensión del área dorso-ventral del ectodermo cefálico que se ha tomado. Tres tipos diferentes de trasplantes han sido realizados: **Tipo 1**, el tercio más dorsal del ectodermo; **Tipo 2**, los dos tercios más dorsales; y **Tipo 3**, todo el ectodermo enfrentado al rombómero considerado. Los tres tercios analizados (Td, Ti y Tv) fueron representados con diferentes intensidades de un mismo color (B). Una parte de la placa alar del tubo neural fue también trasplantada (área oscura). Las flechas indican la línea media del embrión.

6. Detección del territorio trasplantado en el embrión quimera

Durante muchos años, el análisis de las embriones quimeras pollo/codorniz se basó en la realización de la técnica histoquímica de Feulgen-Rossenbeck para la heterocromatina nuclear, que se presenta dispersa en el interior del núcleo en las células de pollo y concentrada alrededor del nucleolo en el caso de las células de codorniz (ver Le Douarin, 2008).

En la actualidad, cabe la posibilidad de detectar las células de codorniz mediante inmunohitoquímica con el anticuerpo monoclonal anti-codorniz, QCPN (Selleck y Bronner-Fraser, 1995). El anticuerpo está dirigido contra la cromatina perinuclear de las células de codorniz. Es específico de especie, por lo que reconoce cualquier derivado, neural o no neural, del tejido de codorniz.



Para esta inmunohistoquímica las secciones se secaron y permeabilizaron del descrito en el Capítulo 1. A continuación, las secciones fueron tratadas con una solución de H_2O_2 0,35 % en PBS-T durante 45 minutos, con la intención de eliminar la actividad peroxidasa endógena del tejido por saturación de sustrato. Se lavaron las muestras con PBS-T 3 veces durante 5 minutos y añadimos la solución de bloqueo (PBS-T-NGS 10%-Lys 0,1 M) durante dos horas. Luego, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario monoclonal QCPN (1/100; DSHB) diluido en PBS-T-NGS al 1 %, durante toda la noche en cámaras húmedas. El anticuerpo ha sido usado en diferentes estudios (ver referencias, Nagy y Olah, 2010)

Al día siguiente, las secciones se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS-T. Después, se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario (1/100; ShAM, *AffiniPure Sheep Anti-Mouse IgG (H+L)*, Jackson ImmunoResearch). Pasadas las 2 horas, se volvió a lavar 3 veces durante 10 minutos con PBS-T. Tras los lavados, las secciones se incubaron 2 hora con el sistema PAP (1/100; *Mouse Peroxidase-AntiPeroxidase*, Jackson ImmunoResearch). Posteriormente, las secciones se volvieron a lavar 3 veces durante 10 minutos con PBS-T y, además, se le dieron otros 2 lavados de 10 minutos cada uno con Tris 0,1 M (pH 7,5).

Por último, se reveló la actividad peroxidasa con una solución que contenía el cromógeno diaminobencidina (DAB) al 0,03 %, sulfato de níquel y amonio al 0,6 %, y agua oxigenada al 0,005 % en Tris 0,1M pH 7,5. La solución de revelado debe ser preparada en el momento de uso y protegida de la luz. Todos los pasos llevados a cabo durante la inmunihistoquímica fueron realizados a temperatura ambiente.

Finalmente, las secciones se lavaron varias veces con PBS-T para eliminar la solución de revelado y se procedió al montaje con Moviol.

Las secciones tratadas con el anticuerpo QCPN, fueron comparadas con secciones alternas a las que se le realizó una hibridación *in situ* con el gen *Fgf10*, que marca todos los elementos sensoriales en este estadio (ver Materiales y Metodos, Capítulo1).

7. Inyecciones de DiI

Otra forma de realizar un mapa de destino es mediante marcaje *in situ* con carbocianinas. Estas son marcadores lipofílicos aplicados extracelularmente y altamente fluorescentes cuando son incorporados dentro de las membranas celulares por su alta hidrofobicidad. Una vez aplicado a las células, este marcador difunde lateralmente dentro de la membrana plasmática, siendo esta característica una desventaja dada la carencia de especificidad. Por otro lado, emiten una intensa fluorescencia con lo cual se facilita su seguimiento. Para esta técnica se siguió el método descrito en el libro de Stern y Holland (1993)

En esta técnica *in ovo* solo utilizamos embriones de pollo. Los embriones usados son del mismo estadio, HH10. El modo de acceder al embrión y darle contraste es similar al realizado para los trasplantes. La diferencia es que, en vez de hacer una operación propiamente dicha, hacemos inyecciones *in situ* con la carbocianina DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocuanine perchlorate; Invitrogen), preparada al 0,5% en etanol 100%.

Las inyecciones de DiI fueron realizadas utilizando micropipetas de vidrio que contenían la solución con el marcador. La mezcla en el eppendorf contiene sacarosa 0.3 M (precalentada) y DiI, dilución 1/10 en etanol 100%.

La mezcla se calienta 1-2 minutos a 45-55 °C. Se agita rápidamente durante unos segundos y se protege de la luz con papel de aluminio. Esta solución debe ser usada el mismo día. Si la utilizamos días después, debe ser almacenada a temperatura ambiente en oscuridad. En este caso, hay que volver a calentar la mezcla hasta disolver bien el DiI justo antes de usarlo. A continuación, se aspira a través de un tubo de goma en donde se coloca el capilar de vidrio.

Una vez realizada la inyección, se realiza un lavado con solución salina para eliminar los restos de marcaje no inyectado. Los embriones inyectados fueron fotografiados bajo la lupa fluorescente inmediatamente después de la inyección. El marcaje de DiI fue visualizado utilizando una longitud de onda con un pico de excitación de 547 nm (verde) donde emite a 571 nm (rojo) (Hatada y Stern, 1994).

Dichas inyecciones fueron realizadas en los bordes del territorio presuntivo de



la placoda ótica, marcando solamente la membrana plasmática de un número reducido de células, permitiéndonos seguir su localización durante el desarrollo embrionario. Una vez realizada la inyección con el DiI, sellamos el huevo y se incubó durante un día (estadio de copa ótica, HH14-15). Luego los embriones fueron fijados con paraformaldehído 4% en PBS 0,1 M y analizados con el microscopio confocal para ver que embriones tenían células marcadas en el epitelio ótico, en el borde o en el ectodermo cefálico que rodea a la copa ótica. Una vez seleccionados los embriones más interesantes, estos fueron congelados y cortados en el criostato para analizar con más detalle las células marcadas con el DiI.

Estas inyecciones fueron realizadas con el fin de afinar más y delimitar de manera más precisa si cabe la extensión de la placoda ótica, ya que la técnica de los trasplantes no nos permitía colocar los límites de la placoda ótica en estadio HH10 con tanta precisión/exactitud.

RESULTADOS

1. Extensión de la placoda ótica en un embrión de estadio HH10

En todos los casos, se realizaron trasplantes homotópicos en el estadio HH10 (10 somitas), tomando el ectodermo cefálico enfrenteado a cada rombómero, unidad segmentaria en la que se subdivide el cerebro posterior o rombencéfalo. Primero, hemos analizado el ectodermo enfrenteado a cada rombómero, desde el r3 al r8, incluyendo el pro-rombómero RC, el cual dará lugar al r6 y r7 (Vaage, 1969). Observamos que el ectodermo enfrenteado al r3 y el r8 nunca participan en la formación del oído interno (no mostrado). Por lo tanto, la placoda ótica está incluida en una porción del ectodermo cefálico que se extiende desde el r4 al RC (r6 más r7).

2. Mapa de destino del ectodermo cefálico enfrenteado al rombómero 4 (r4)

En primer lugar, se realizó el trasplante del tercio más dorsal del ectodermo (ect) enfrenteado al r4, justo en el estadio HH10 (10 somitas) (ect r4 tipo 1; Td; azul oscuro; Fig. 21A). Secciones horizontales a través de oído interno quimera de estadio HH29 muestran que las células de codorniz, marcadas con el anticuerpo QCPN, se localizan en la porción antero-lateral del sistema endolinfático, formando una banda dorso-ventral (se y ce; flechas en Fig. 21B,C). En la porción dorsal del vestíbulo, las células del trasplante fueron observadas en un área inmediatamente rostral a la inserción del conducto endolinfático (flechas en Fig. 21D,E), lejos de la cresta anterior y posterior (ca y cp; Fig. 21D). En secciones más ventrales, la porción que ocupa el trasplante es mucho mayor (flecha en Fig. 22F), extendiéndose rostralmente hacia la cresta anterior (ca), *Fgf10* positiva (Sánchez-Guardado *et al.*, 2012), pero sin llegar a contactar con ella (comparar cabezas de flecha en Fig. 21F,G). La zona trasplantada se extiende ventralmente hacia la mácula del sáculo, la cual muestra un número muy reducido de células QCPN positivas en su parte más dorsal (no mostrado).

En segundo lugar, se trasplantó la porción del ectodermo correspondiente a los dos tercios más dorsales del ectodermo enfrenteado al r4 (ect r4 tipo 2; Td y Ti; azul oscuro e intermedio; Fig. 21H). Este tipo de trasplantes sirve para corroborar los resultados obtenidos en el trasplante anterior (tipo 1) y para determinar el destino de la porción intermedia del ectodermo trasplantado, el tercio intermedio (Ti, azul intermedio). Las células de codorniz fueron detectadas en la porción antero-lateral del



sistema endolinfático de un oído interno quimera (no mostrado), tal y como se vio en el trasplante tipo 1 del r4 (Fig. 21C-E). En este tipo de trasplantes, la mácula del utrículo siempre está marcada en su totalidad por el anticuerpo QCPN (Fig. 21I-K). El borde lateral de estos trasplantes se aproxima a la cresta lateral por su parte medial, pero no llega a limitarla (cl; cabezas de flecha grandes en Fig. 21I,J). El resto de los elementos sensoriales carecieron de células de codorniz, excepto la mácula del sáculo, la cual presenta algunas células QCPN positivas en su parte más dorsal (ms; flechas en Fig. 21I,J). Resaltar que el epitelio ótico que separa a la mácula del utrículo de la mácula del sáculo no presentaba células procedentes del trasplante (ver cabezas de flecha pequeñas en Fig. 21I,J).

Finalmente, todo el ectodermo enfrentado al r4 fue trasplantado, tomando desde la línea medial del embrión de pollo hasta el borde del embrión (ect r4 tipo3; Td, Ti y Tv; azul oscuro, intermedio y claro; Fig. 21L). Este tipo de trasplantes sirven para corroborar los resultados obtenidos en los trasplantes anteriores (tipo 1 y tipo 2), y para determinar el destino de la porción más ventral del ectodermo trasplantado, el tercio más ventral (Tv; azul más claro). Es interesante notar que la mitad medial de la cresta anterior, pero no su mitad lateral, presenta células QCPN positivas (ca; ver cabezas de flecha en Fig. 21M,N). La pared medial de la porción anterior de la bolsa vertical (a-bv), estructura no sensorial de donde se desarrollara el canal semicircular anterior, también fue marcada por el anticuerpo QCPN (flecha en Fig. 21M). En secciones más ventrales, el borde lateral del trasplante coincide con el borde medial de la cresta lateral (cl; cabezas de flecha grandes en Fig. 21O,P). La pared del utrículo estaba claramente constituida por células QCPN positivas (mu; Fig. 21O,P). El área entre la mácula del utrículo y la mácula del sáculo está constituida por células de codorniz (cabezas de flecha pequeñas en Fig. 21O,P). Un análisis comparativo de los experimentos tipo 1, 2, y 3 podrían ayudarnos a determinar el destino de los tres tercios (dorsal, intermedio y ventral) en los que hemos subdividido el ectodermo enfrentado al r4 (Fig. 21A,H,L).

Las Figuras 21Q y 21R resumen, en el oído interno de un embrión quimera de estadio HH29 (E6), el destino de las células de codorniz procedentes de los tres tipos de trasplantes realizados del ectodermo enfrentado al r4.

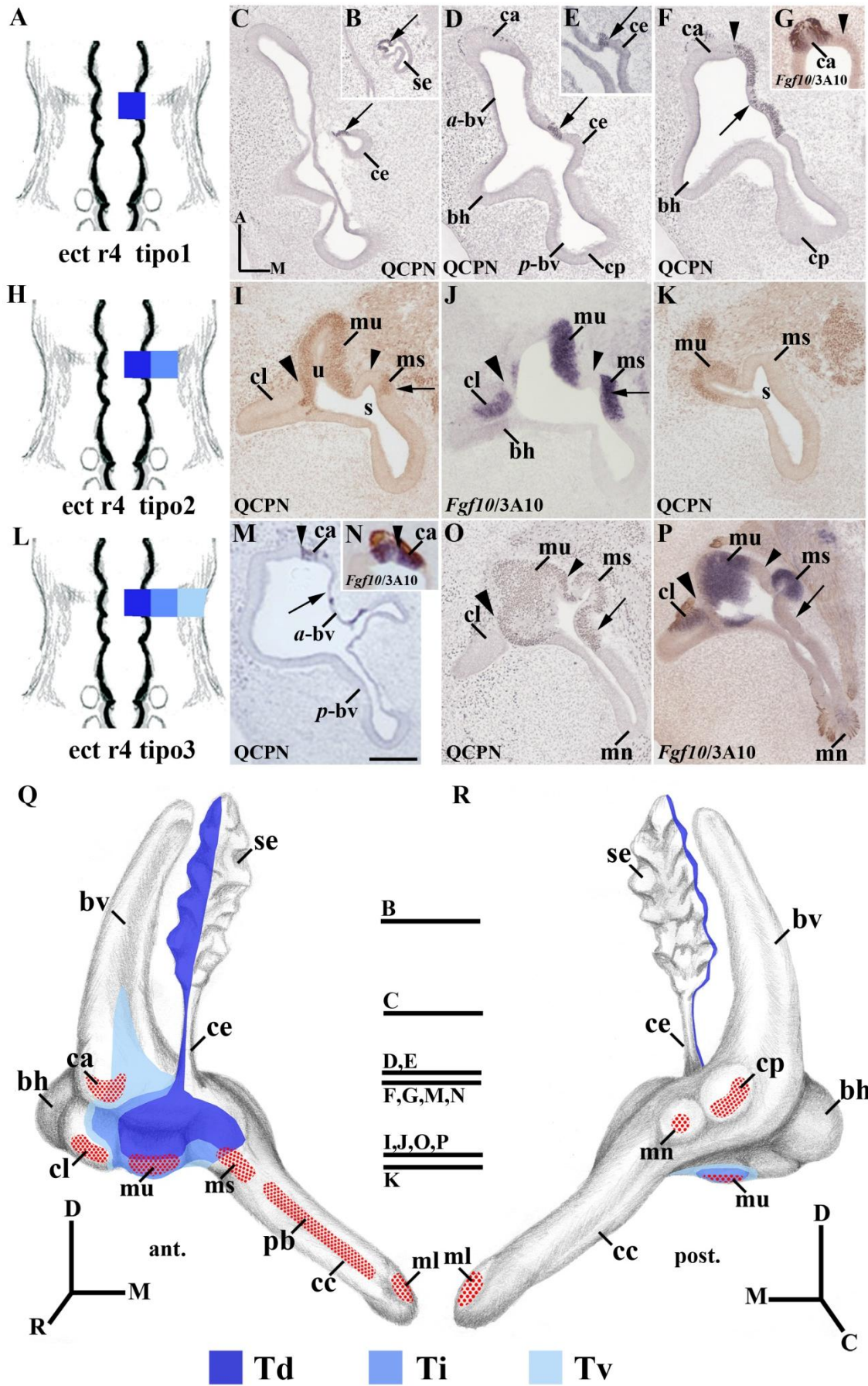




Figure 22. Mapa de destino del ectodermo enfrentado al r4. (A) Representación esquemática del trasplante tipo1 del ectodermo enfrentado al r4 (azul oscuro), realizado en el embrión de estadio HH10. (B-G) Secciones horizontales a través del oído interno quimera tipo 1 en el estadio HH29 (E6). El anticuerpo y sonda usada se indica en cada imagen. Las células de codorniz fueron detectadas en la porción antero-lateral del sistema endolinfático (se y ce; flechas en B,C) y en la pared antero-medial del vestíbulo (flechas en D,E). La cresta anterior no presenta células del trasplante (ver cabezas de flecha en F,G). (H) Representación esquemática de los trasplantes tipo 2 (Td más Ti; azul oscuro e intermedio). (I-K) En secciones horizontales, además del sistema endolinfático y la pared anterior del vestíbulo, las células de codorniz fueron detectadas en toda la mácula del utrículo (mu; I-K). Una pequeña porción dorsal de la mácula del sáculo muestra células QCPN positivas (ms; flecha pequeña en I,J). (L) Representación esquemática de trasplantes tipo 3 correspondientes a todo el ectodermo enfrentado al r4 (Td, Ti y Tv; azul oscuro, intermedio y claro). (M-P) En trasplantes tipo 3 del r4, las células trasplantadas fueron observadas en la mitad medial de la cresta anterior (ca; ver cabezas de flecha en M,N) y la pared medial de la porción anterior de la bolsa vertical (a-bv; flecha en M). El borde del epitelio trasplantado y la cresta lateral coinciden (cabezas de flecha grande en O,P). (Q,R) Diagramas tridimensionales del oído interno de estadio E6, visión anterior y posterior, que resumen los resultados de los embriones quimeras. Las tres tonalidades usadas representan las tres porciones del ectodermo enfrentado al r4 que fueron trasplantadas (Td, azul oscuro; Ti, azul intermedio; Tv, azul claro). Las zonas sensoriales se representan por áreas punteadas de rojo. Las secciones horizontales también son indicadas. Orientación: D, dorsal; M, medial; P, posterior; R, rostral. La barra de aumentos en M indica 72 μ m (aplicado C-G, I-K, M-P).

3. Mapa de destino del ectodermo enfrentado al rombómero 5 (r5)

Del mismo modo, trasplantes homotópicos de los tres tipos fueron llevados a cabo en embriones de estadio HH10 para determinar el destino del ectodermo enfrentado al r5 (Fig. 22). En los trasplantes del tercio más dorsal (ect r5 tipo 1; Td; rojo oscuro; Fig. 22A), las células de codorniz fueron observadas en la porción antero-medial del sistema endolinfático, formando también una banda dorso-ventral (se y ce; flechas en Fig. 22B,C), justamente contiguo al territorio del trasplante tipo 1 del ectodermo enfrentado al r4 (flechas en Fig. 21C-E). En el vestíbulo, las células de codorniz fueron detectadas en un pequeño área en la inserción del conducto endolinfático (flecha en Fig. 22C). Parte del territorio trasplantado forma una banda dorso-ventral en la parte proximal del conducto coclear. Dicha banda se sitúa cerca de la mácula del sáculo y el tercio proximal de la papila basilar (ms y pb; flechas en Fig. 22D-G), incluso introduciéndose un poco en ambos elementos sensoriales por su borde más medial, estando el resto de dichos territorios sensoriales desprovistos de células QCPN positivas (comparar cabezas de flecha en Fig. 22D-G).

A continuación, se realizaron trasplantes de los dos tercios más dorsales del ectodermo enfrentado al r5 (ect r5 tipo 2; Td más Ti; rojo oscuro e intermedio; Fig. 22H). En estos embriones quimera, las células del trasplante fueron encontradas en el sistema endolinfático y en su inserción al vestíbulo (ver tipo 1, Fig. 22B,C). La mácula del sáculo muestra células QCPN positivas en toda su extensión (ms; Fig. 22I,J), excepto en una pequeña porción más dorsal (no mostrado). Notar como las células de codorniz se extienden más lateralmente que el territorio de la mácula del sáculo *Fgf10* positivo (comparar cabezas de flecha en Fig. 22I,J), correspondiente a la porción de la pared del sáculo. La porción más proximal de la papila basilar, cercana al sáculo, también muestra células QCPN positivas (Fig. 22K,L). El resto de la papila basilar no presenta células de codorniz (no mostrado). Observar que en la porción proximal del conducto coclear, el trasplante se extiende lateral y medialmente más allá del territorio *Fgf10* positivo e innervado de la papila basilar (comparar flechas en Fig. 22K,L). Además, la extensión lateral del trasplante a nivel de la papila basilar coincide con el límite anterior del territorio *Fgf10* positivo, que corresponde con un territorio no neural, tal y como se mostró en el Capítulo 1 (ver Fig. 18D).

Para concluir el análisis del ectodermo cefálico enfrentado al r5, se trasplantó todo ese ectodermo (ect r5 tipo 3; Td, Ti y Tv; rojo oscuro, intermedio, y claro; Fig. 22M). En todos los embriones quimeras analizados, las células marcadas por el anticuerpo QCPN fueron observadas en la banda dorso-ventral del sistema endolinfático (ce; Fig. 22N). Toda la bolsa horizontal, que dará al futuro canal semicircular lateral, estuvo incluida en el territorio trasplantado (bh; Fig. 22N). De acuerdo con estos resultados, la cresta lateral, que es *Fgf10* positiva, también estuvo incluida en el trasplante (cl; Fig. 22P). Además, el trasplante se extiende rostralmente hacia la cresta anterior, *Fgf10* positiva (ca; Fig. 22O), incluyendo la pared lateral de la mitad anterior de la bolsa vertical (a-bv; Fig. 22N). La bolsa vertical participa en la formación del canal semicircular anterior. Es interesante destacar que la mitad lateral de la cresta anterior, pero no la mitad medial, estuvo constituida por células de codorniz (comparar cabezas de flecha en Fig. 22N,O). Prácticamente toda la macula del sáculo (ms; Fig. 22P,Q) y la parte proximal de la papila basilar (pb; Fig. 22R) fueron también QCPN positivas. Las células de codorniz también se encontraron ocupando la mitad anterior de la porción proximal del conducto coclear (flechas en Fig. 22Q,R).



Las Figuras 22S y 22T resumen la distribución de las células provenientes de los tres tipos de trasplantes realizados del ectodermo enfrentado al r5, en una visión anterior y posterior del oído interno en embriones de estadio HH29.

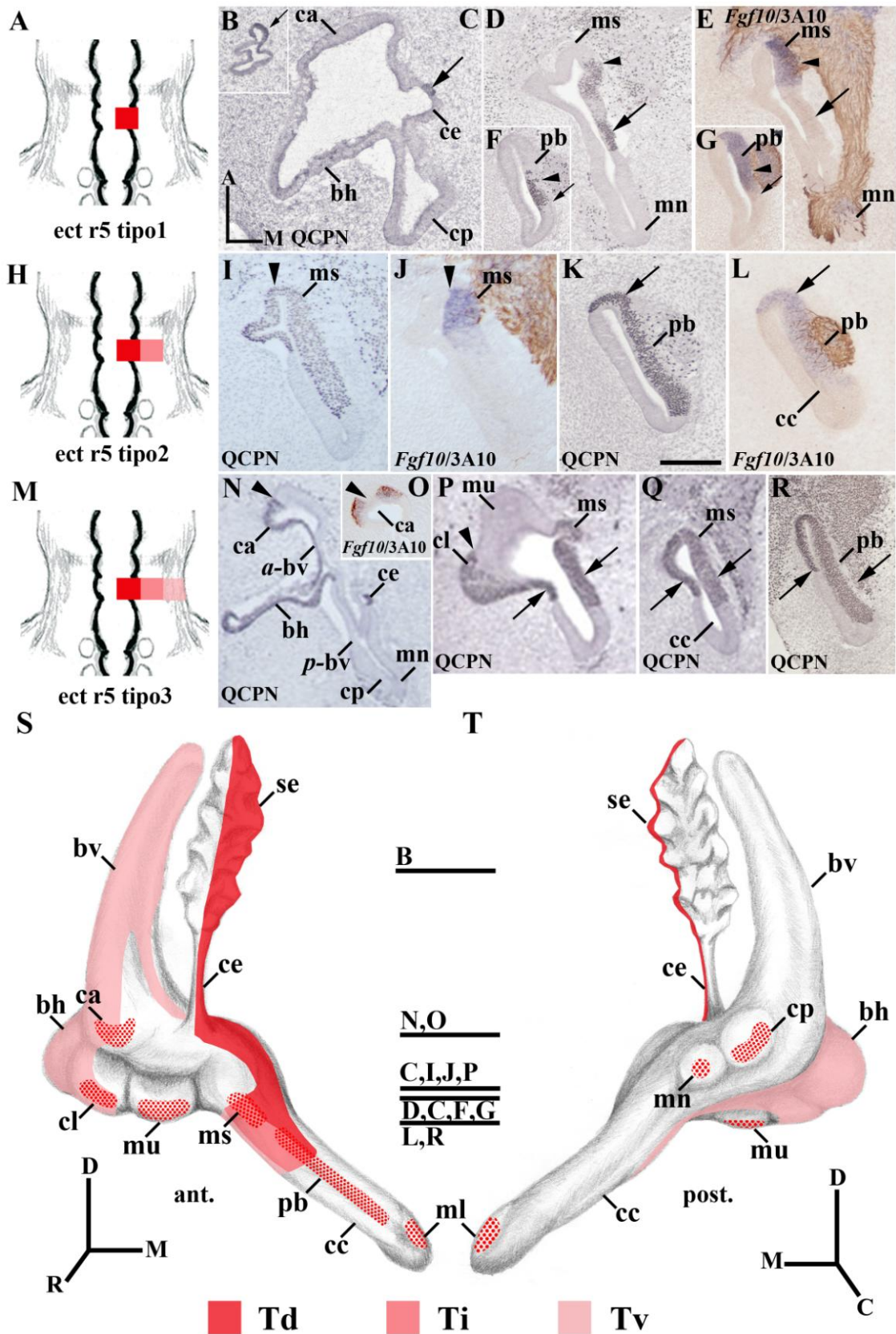


Figura 23. Mapa de destino del ectodermo cefálico enfrentado al r5. **(A)** Representación esquemática del trasplante tipo1 del r5 (rojo oscuro) en un embrión de estadio HH10. **(B-G)** Secciones horizontales a través de los embriones quimeras tipo 1 (Td) de estadio HH29 (E6). Las células de codorniz fueron detectadas en la porción antero-medial del sistema endolinfático (flecha en B) y en la porción medial en la inserción al conducto coclear (flecha en C). Algunas células fueron observadas exclusivamente en la parte medial, tanto de la mácula del sáculo (ms; D,E) como de la porción proximal de la papila basilar (pb; F,G). **(H)** Representación esquemática del trasplante tipo 2 del r5 (Td más Ti; rojo oscuro e intermedio). **(I-L)** Secciones horizontales de un embrión quimera tipo 2. En este tipo de trasplantes, las células de codorniz fueron observadas en el sistema endolinfático (no mostrado). Células QCPN positivas fueron detectadas en la mácula del sáculo y la parte proximal de la papila basilar (ms y pb; I-L). Además, dichos trasplantes se extienden lateralmente más allá del límite anterior innervado de ambos elementos sensoriales (ms; cabezas de flecha en I,J; pb, flechas en K,L). **(M)** Representación esquemática del trasplante tipo 3 del r5 (Td, Ti y Tv; rojo oscuro, intermedio y claro). **(N-R)** Secciones horizontales de oído interno quimeras tipo 3. Las células de codorniz fueron detectadas en el sistema endolinfático (ce; N), en casi toda la mácula del sáculo (ms; P,Q) y en la porción proximal de la papila basilar (pb; R). También se observaron células del trasplante en toda la cresta lateral y bolsa horizontal (cl; P, y bh; N), así como en la pared lateral de la porción anterior de la bolsa horizontal (a-bv; N). Solamente la mitad lateral de la cresta anterior estaba dentro del epitelio trasplantado (comparar cabezas de flecha en N,O). La mitad anterior del conducto coclear proximal es QCPN positivo (Q,R). **(S,T)** Esquemas tridimensionales de un oído interno quimera de estadio E6, resumiendo todos los resultados anteriores. Las tres intensidades de color representan los tres tipos de tercios considerados en el ectodermo enfrentado al r5 (Td, rojo oscuro; Ti, rojo intermedio; Tv, rojo claro). Los elementos sensoriales están representados con puntos rojos. Orientación: D, dorsal; M, medial; P, posterior; R, rostral. La barra de aumentos en K indica 65 μ m (aplicado a B-G, I-L, N-R).

4. Mapa de destino del ectodermo enfrentado al pro-rombómero C

4.1. Mapa de destino del ectodermo enfrentado al rombómero 6 (r6)

Para determinar el mapa de destino del ectodermo enfrentado al pro-rombómero C (RC), el cual se dividirá para dar lugar al r6 y r7 (Vaage, 1969), primeramente nos hemos focalizado en la mitad rostral del RC, el futuro r6 (Fig. 23). Cuando trasplantamos el tercio más dorsal del r6 (ect r6 tipo 1; Td; verde oscuro; Fig. 23A), las células de codorniz se encontraron formando una banda dorso-ventral a lo largo del oído interno. Las células QCPN positivas fueron observadas en la porción caudal del sistema endolinfático (ce; flecha en Fig. 23B) y en su inserción al vestíbulo (flecha en Fig. 23C). En el conducto coclear, algunas células marcadas fueron observadas en la porción más caudal del territorio de la papila basilar, *Fgf10* positiva (pb; ver cabezas de flecha



en Fig. 23D,E). Resaltar que algunas células de codorniz se encontraron dispersas por el área de expresión de *Fgf10* (flecha en Fig. 23D). La mácula de la lagena, localizada en la porción distal del conducto coclear, se encuentra delimitada en su parte anterior por el epitelio trasplantado (cabezas de flecha en Fig. 23F,G)

Cuando se trasplantaron los dos tercios más dorsales del ectodermo enfrentado a la mitad rostral de RC (ect r6 tipo 2; Td más Ti; verde oscuro e intermedio; Fig. 23H), además de la porción caudal del sistema endolinfático (ver Fig. 23B), gran parte del territorio posterior de la bolsa vertical (*p-bv*), la cual dará al canal semicircular posterior, presentó células de codorniz (flecha en Fig. 23I). La mitad ventral del territorio de la cresta posterior, marcado por la expresión del gen *Fgf10*, se encontró dentro del trasplante (comparar cabezas de flecha en Fig. 23I,J). Del mismo modo, la mitad ventral de la mácula neglecta estaba constituida por células provenientes del trasplante (mn; Fig. 23K,L). En el vestíbulo, el resto de los elementos sensoriales nunca presentaron células de codorniz (Fig. 23I-L). En el conducto coclear, las células de codorniz estaban ocupando gran parte del epitelio coclear, en concreto más de la mitad distal (Fig. 23M,N). Así, la papila basilar (pb; Fig. 23M), excluyendo su porción más proximal, y toda la macula de la lagena (ml; Fig. 23N) estaban incluidas en el territorio trasplantado.

También se realizaron trasplantes de todo el ectodermo enfrentado a la mitad rostral del RC (ect r6 tipo 3; Td, Ti y Tv; verde oscuro, intermedio y claro; Fig. 23O). Este tipo de trasplantes confirman que el tercio más ventral del ectodermo trasplantado contribuirá a formar la porción posterior de la bolsa vertical (*p-bv*; flechas en Fig. 23P,Q). La cresta posterior ahora estuvo totalmente incluida en el territorio trasplantado (cp; Fig. 23Q,R).

Las Figuras 23S y 23T resumen, con diferentes tonalidades del color verde, la exacta distribución de las células de codorniz cuando se toman los diferentes tercios del ectodermo enfrentado a la mitad rostral del RC.

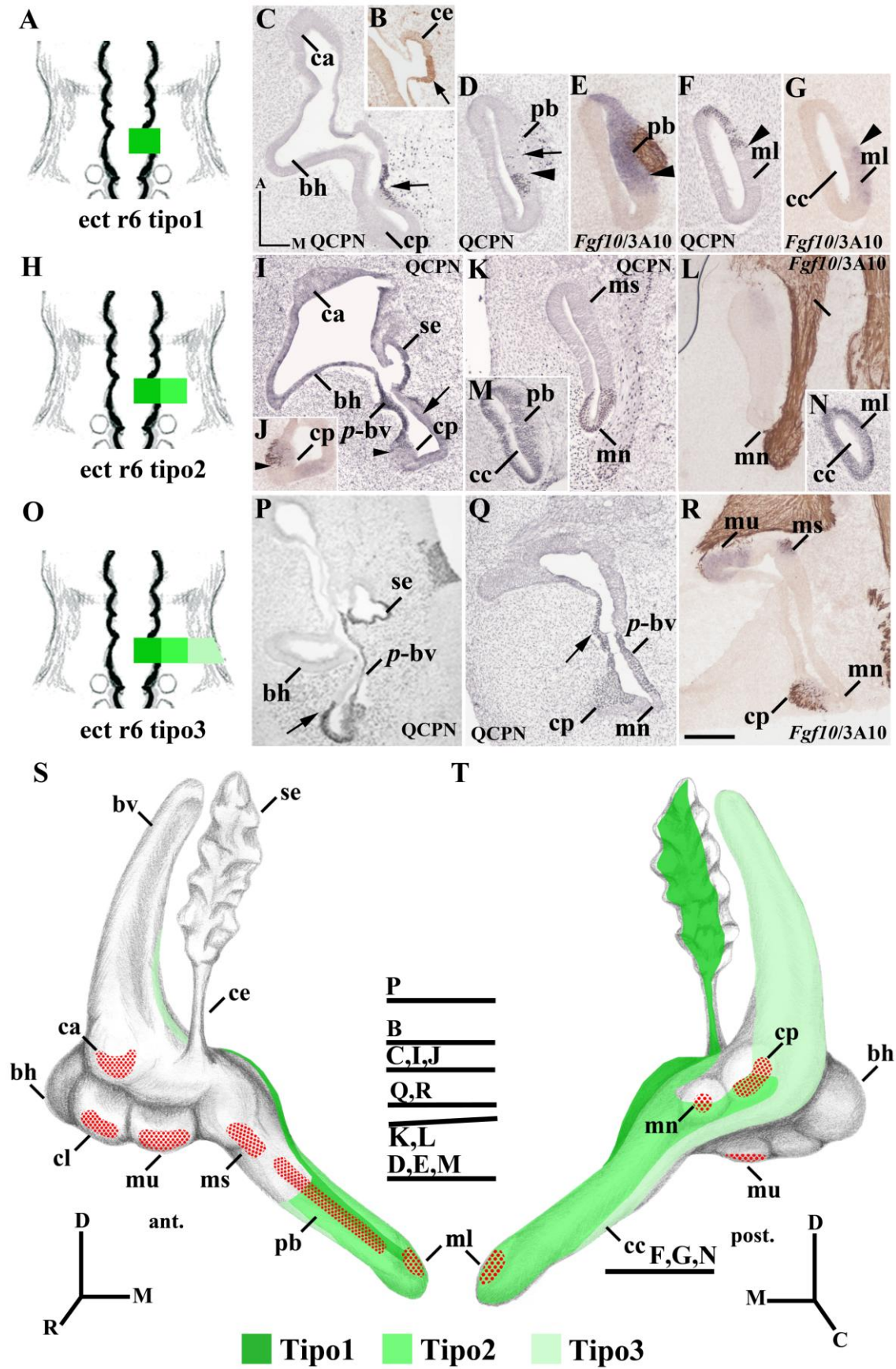




Figura 24. Mapa de destino del ectodermo enfrentado a la mitad rostral del RC, el futuro r6. **(A)** Representación esquemática del trasplante tipo 1 (Td) del r6 en un embrión de estadio HH10 (10 somitas; verde oscuro). **(B-G)** Secciones horizontales a través de los embriones quimeras tipo1 de estadio HH29 (E6). Las células de codorniz fueron detectadas en la porción posterior del sistema endolinfático (ce en B) y en su inserción al vestíbulo (flecha en C). El área trasplantada incluye una pequeña porción en la parte caudal de la papila basilar (comparar cabezas de flecha en D,E). Algunas células de codorniz dispersas se encontraron en el territorio *Fgf10* positivo de la papila basilar (flecha en D). En la porción distal del conducto coclear, el trasplante se encuentra delimitando rostralmente a la mácula de la lagena (comparar cabezas de flecha en F,G). **(H)** Representación esquemática del trasplante tipo 2 del r6 (Td más Ti; verde oscuro e intermedio). **(I-N)** En secciones horizontales, el ectodermo trasplantado fue detectado en la pared posterior de la bolsa vertical (*p-bv*; I) y en más de la mitad distal del conducto coclear (*cc*; M,N). La mitad ventral de la cresta posterior (*cp*; cabezas de flecha en J,I) y de la mácula neglecta (*mn*; K,L), así como los dos tercios distales de la papila basilar (*pb*; M) y toda la mácula de la lagena (*ml*; N) se marcaron con el anticuerpo QCPN. **(O)** Representación esquemática de los trasplantes de todo el ectodermo enfrentado a la mitad rostral del RC, tipo 3 del r6 (Td, Ti y Tv; verde oscuro, intermedio y claro). **(P-R)** Secciones horizontales a través del oído interno quimera tipo 3 de estadio E6. Remarcar las células de codorniz se encuentran en todo el territorio de la cresta posterior, *Fgf10* positiva (*cp*; Q,R). **(S,T)** Esquemas tridimensionales del oído interno de estadio HH29 (E6), en donde se resumen todos los resultados anteriores. Las diferentes tonalidades de verde representan los tres tipos de trasplantes que se han realizado en el ectodermo enfrentado al futuro r6 (Td; verde oscuro; Ti, verde intermedio; Tv, verde claro). Los elementos sensoriales están representados con puntos rojos. Orientación: D, dorsal; M, medial; P, posterior; R, rostral. La barra de aumentos en R indica 67 μ m (aplicado a B-G, I-N, P-R).

4.2. Mapa de destino del ectodermo enfrentado al rombómero 7 (r7)

Para concluir nuestro estudio, se realizaron trasplantes de la mitad caudal del RC, futuro r7. Cuando trasplantamos el tercio más dorsal del ectodermo enfrentado a dicha porción (ect r7 tipo 1; Td; naranja oscuro; no mostrado, ver Fig. 25A), las células de codorniz fueron encontradas formando una estrecha banda dorso-ventral en el sistema endolinfático (no mostrado; similar a cabeza de flecha en Fig. 25B). Los embriones quimeras con trasplantes de los dos tercios más dorsales del ectodermo (ect r7 tipo2; Td y Ti; naranja oscuro e intermedio; no mostrado, ver Fig. 25A) contenía a la mitad dorsal de la mácula neglecta (*mn*; similar a Fig. 25E,F), mientras que las células de codorniz fueron ausentes en la mitad ventral (*mn*; similar a Fig. 25G,H). Trasplantes de los dos tercios dorsales, se encuentran delimitando parcialmente la cresta posterior (comparar cabezas de flecha en Fig. 25C,D). Finalmente, trasplantes de todo el ectodermo enfrentado a la mitad caudal del RC (ect r7 tipo 3; naranja oscuro,

intermedio y claro; Fig. 25A) participa en la formación de todas las estructuras señaladas anteriormetne y de la bolsa vertical (ver flecha en Fig. 25C). Las Figura 25I y 25J resumen la distribución exacta de las células procedentes del ectodermo enfrentado a la mitad caudal del RC en el oído interno de estadio HH29, en una visión anterior y posterior.

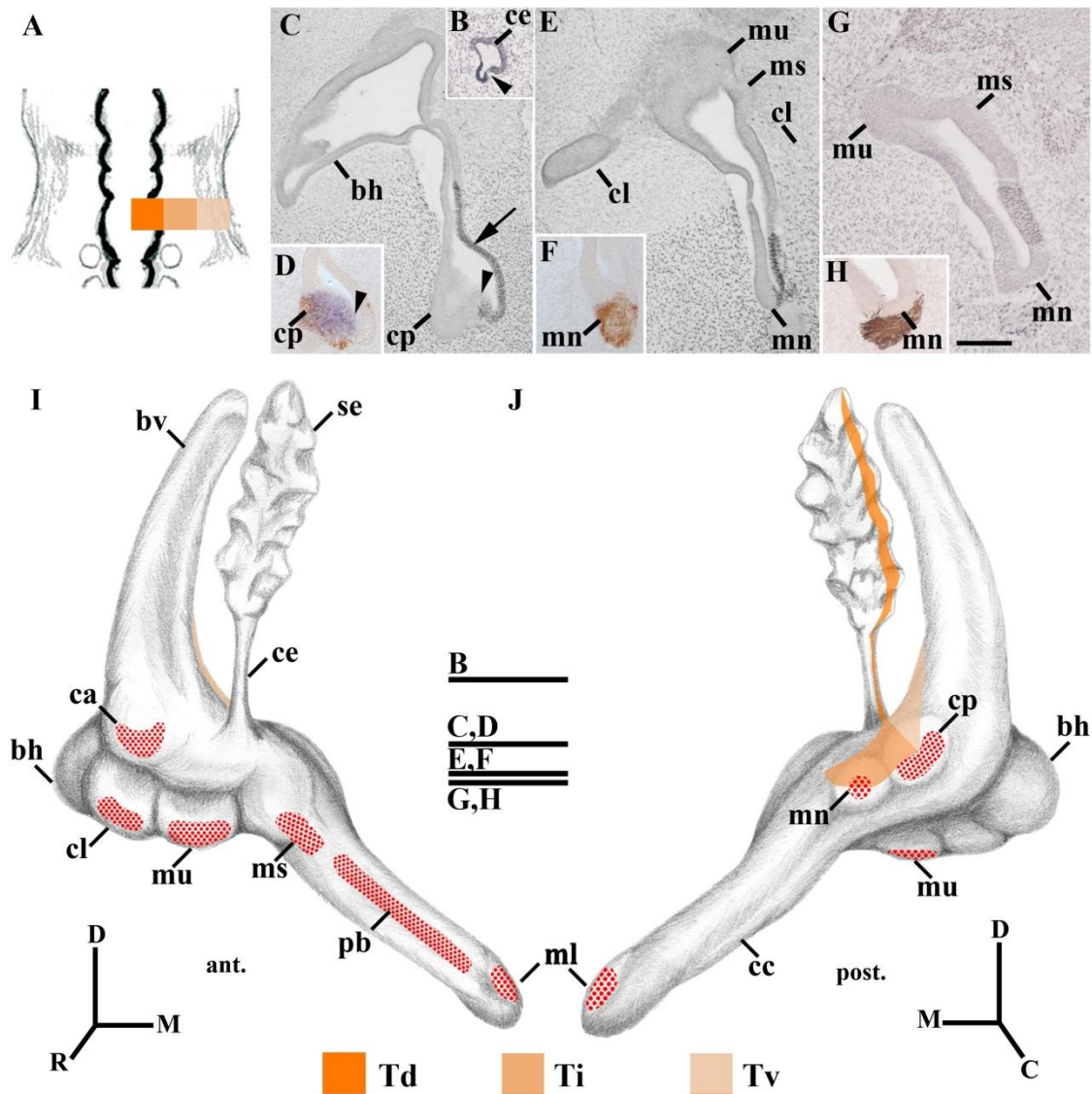


Figura 25. Mapa de destino del ectodermo enfrentado a la mitad caudal del RC, el futuro r7. (A) Esquema de un embrión de estadio HH10, donde se representa con diferentes tonalidades de naranja los tres tercios de esta porción del ectodermo cefálico. (C-H) Secciones horizontales a través del oído interno trasplantado de estadio HH29 (E6), trasplante tipo3. Las células de codorniz fueron detectadas en el sistema endolinfático (ce; B) y en la porción caudal de la bolsa vertical del oído interno quimera (flecha en C), llegando a delimitar el territorio de la cresta posterior (comparar cabezas de flecha en C,D). La mitad dorsal del territorio inervado de la mácula neglecta (mn; E,F), pero no su mitad ventral (mn; G,H)



presentan células QCPN-positivas. **(I,J)** Esquema tridimensional del oído interno quimera de estadio E6, en una visión anterior y posterior, donde se resume el destino de los tres tercios del ectodermo enfrentado al futuro r7. Los elementos sensoriales están representados con puntos rojos. Orientación: D, dorsal; M, medial; P, posterior; R, rostral. La barra de aumentos en G indica 53 μ m (aplicado a B-H).

5. Resumen de los trasplantes realizados

La Figura 26 resume el destino de los doce porciones en los que se ha dividido el territorio de la placoda ótica (Fig. 26A) en el oído interno de estadio E6 (Fig. 26B), usando la misma escala de colores utilizada en cada tipo de experimento. A partir de los resultados obtenidos de analizar los oídos internos quimeras de estadio E6 (Fig. 26B), se extrapolaron los elementos sensoriales al esquema de la placoda ótica (Fig. 26A). Por lo tanto, nuestros resultados han revelado que: (1) la **mácula del utrículo** proviene principalmente del tercio intermedio de r4 y muy poco del tercio dorsal de r4. (2) La **mácula del sáculo** se origina de cuatro compartimentos: el tercio intermedio de r5 es el que más aporta a dicha mácula, también del tercio dorsal de r5 contribuye a la formación de la mácula del sáculo, y en menor medida el tercio dorsal e intermedio de r4. (3) La **cresta anterior** se origina de los tercios ventrales de r4 y r5, contribuyendo cada dominio con la mitad de dicha cresta. (4) La **cresta lateral** se origina completamente del tercio ventral de r5. (5) La mayor parte de la **papila basilar** proviene del tercio intermedio de r6, aunque el tercio intermedio de r5 también aporta una parte considerable. En menor medida, el tercio dorsal de r5 y r6 contribuyen en la formación de la papila basilar. (6) La **mácula de la lagena** se origina principalmente del tercio intermedio de r6, aunque el tercio dorsal también aporta una porción. (7) La **mácula neglecta** se forma a caballo entre el tercio intermedio de r6 y r7. (8) La **cresta posterior** se origina entre el tercio intermedio y ventral de r6.

La Figura 26C representa un esquema tridimensional de una visión dorsal del oído interno de estadio HH29 (visión anterior; Fig. 26B), donde se observa la confluencia de diferentes porciones trasplantadas, inmediatamente lateral a la inserción del sistema endolinfático al vestíbulo y medial a la bolsa vertical. Esta convergencia corresponde con el cierre del poro ótico, producido en el paso de estadio de copa ótica a vesícula ótica. Por lo tanto, el cierre del poro ótico considerado el punto dorsal del oído, se encuentra en la parte dorsal del vestíbulo, situada entre el sistema endolinfático y la bolsa vertical. La localización de este punto, cierre del poro ótico, coincide con el

propuesto por Brigande y colaboradores (2000a). Es decir, este punto es el punto más dorsal deleje dorso-ventral del oído interno.

Finalmente, se ha dibujado el territorio correspondiente a cada una de las porciones trasplantadas en algunas de las secciones más representativas del oído interno de estadio E6 (Fig. 26D).

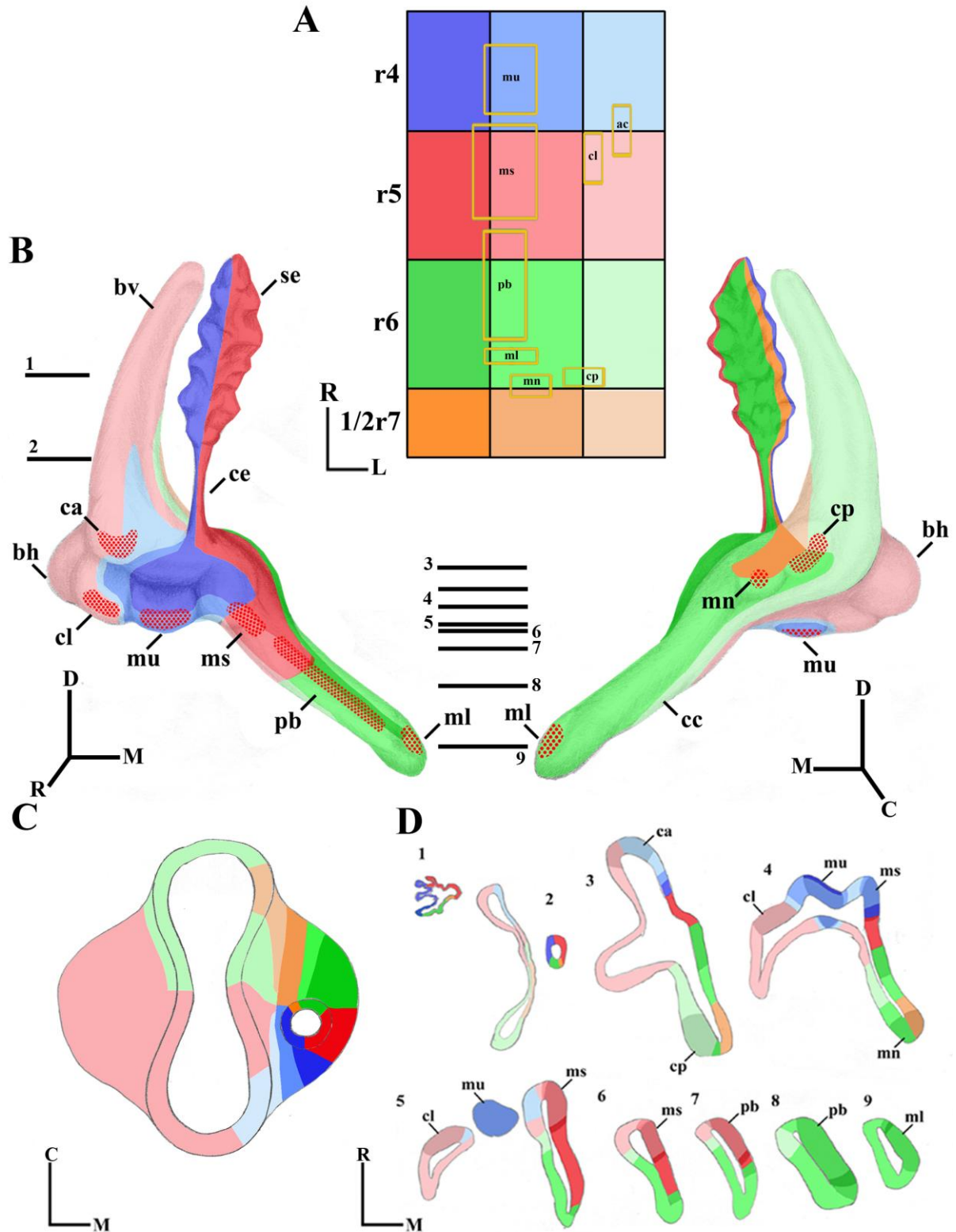




Figura 26. (A) Representación esquemática del mapa de destino de la placoda de pollo en estadio de 10 somitas (HH10), centrándonos en el origen de los elementos sensoriales. Las doce porciones consideradas de la placoda ótica están indicadas, manteniendo la misma escala de colores. (B) Esquema tridimensional del oído interno de estadio E6, visión anterior y posterior, sobre el que se resume el destino de los doce territorios estudiados. Los elementos sensoriales están representados como áreas con puntos rojos. (C) Esquema tridimensional de una visión dorsal del oído interno de estadio E6 (ver B), donde se muestra la confluencia de 10 porciones que participan en la formación del poro ótico. (D) Secciones horizontales a través del oído interno de estadio E6, en las cuales se representa la distribución de cada porción de la placoda ótica. Orientación: D, dorsal; M, medial; C, caudal; R, rostral.

6. Mapa de destino de la mitad dorso-ventral y la mitad rostro-caudal de la placoda ótica

Para obtener el mapa de destino de la mitad dorso-ventral de oído interno, se realizaron trasplantes de la mitad dorsal de toda la extensión de la placoda ótica (ect dorsal r4, r5, r6, y mitad anterior del r7; marrón en Fig. 27A). En secciones horizontales a través del oído interno de estadio E6, las células de codorniz fueron localizadas en todo el sistema endolinfático (se, ce; Fig. 27B). Del mismo modo, se observaron células procedentes del trasplante en la porción medial del vestíbulo, acercándose a la cresta anterior, y quedando lejos de la cresta posterior (ca, cp; Fig. 27C,D). Sin embargo, la mitad medial de la mácula neglecta se encontraba dentro del territorio trasplantado (mn; Fig. 27E). En la parte más ventral del vestíbulo y en el conducto coclear, las células de codorniz se detectaron en toda la mácula del utrículo, mácula del sáculo, papila basilar y mácula de la lagena (mu, ms, pb, ml; Fig. 27F-H). Dicho trasplante se encuentra formando una banda dorso-ventral a lo largo del conducto coclear en su cara medial (flechas en Fig. 27G,H). También, destacar que parte del epitelio que separa la mácula del utrículo de la mácula del sáculo no muestra células QCPN positivas (cabeza de flecha en Fig. 27F). La Figura 27I resume la localización exacta de las células de codorniz procedentes de la mitad dorsal de la placoda ótica en el esquema tridimensional de un oído interno quimera de estadio HH29 (E6).

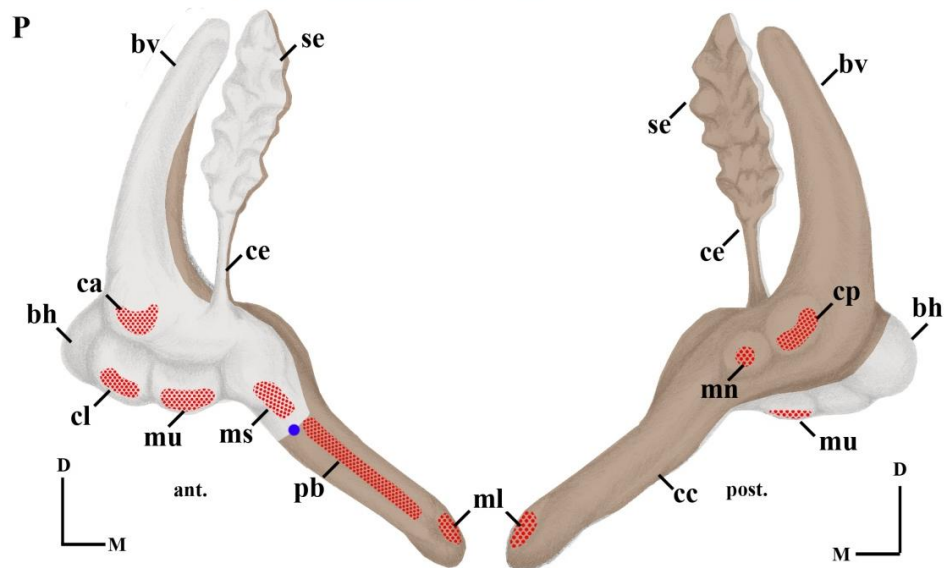
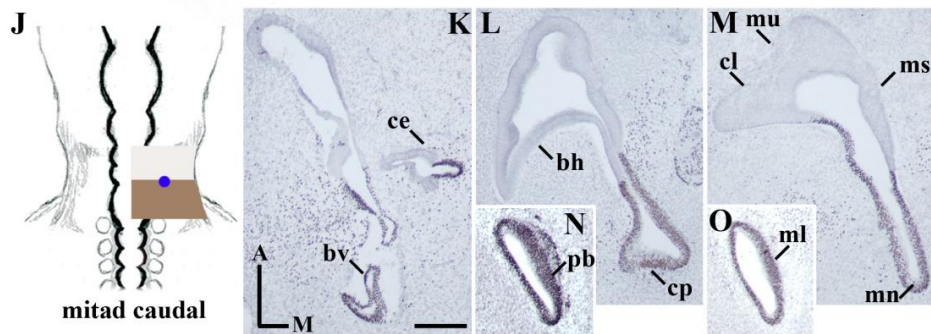
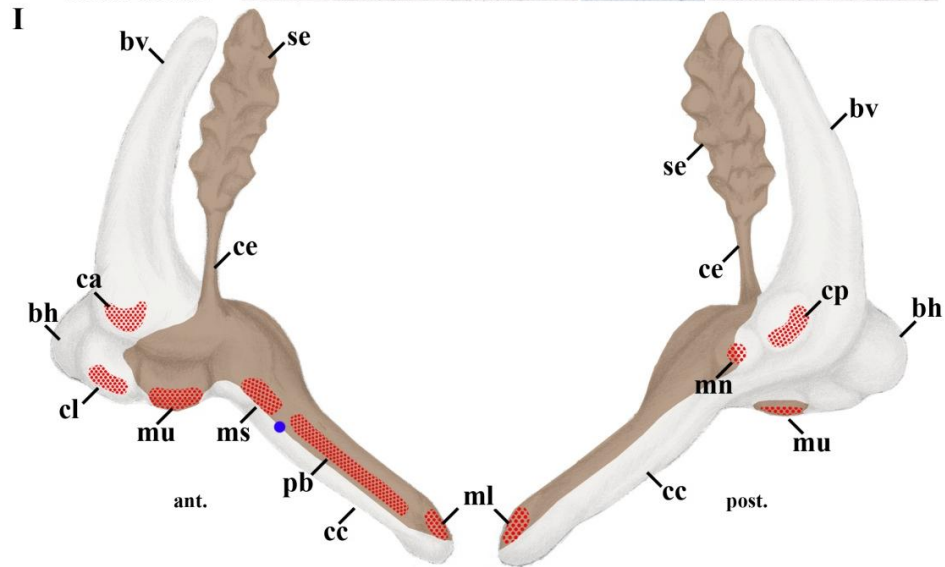
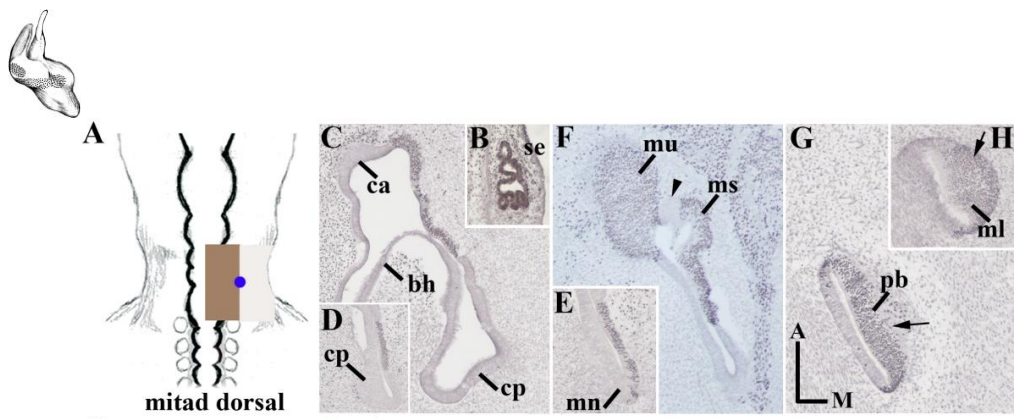
La Figura 27J representa un esquema de un embrión de estadio HH10, en donde se representa de color marrón el territorio trasplantado con la intención de hacer el mapa de destino rostro-caudal (ect caudal enfrentado a $\frac{1}{4}$ caudal del r5, r6, y mitad anterior del r7; marrón en Fig. 27J). Secciones transversales a través del oído interno de estadio E6 muestran que las células procedentes del trasplante se localizaban prácticamente en la mitad posterior del oído interno. Las células de codorniz se observaron en la pared

posterior del sistema endolinfático y la bolsa vertical, incluyendo a la cresta posterior y la mácula neglecta (ver Fig. 27K-M). También, se encontraron células QCPN positivas en prácticamente todo el conducto coclear, estando marcadas por el anticuerpo QCPN toda la papila basilar y la mácula de la lagena (pb, ml; Fig. 27N,O). Solamente la cara rostral de la parte proximal del conducto coclear quedó excluida del trasplante (no mostrado). En la Figura 27P, se representa un esquema tridimensional del oído interno de estadio E6, donde se resume el trasplante de la mitad caudal de la placoda ótica.

En los esquemas 27A,I,J,P se ha representado de color gris el territorio que queda fuera del epitelio trasplantado. Además, en dicho esquemas se ha colocado un punto azul que corresponde con el punto de intersección entre la línea media del dominio dorso-ventral y el dominio rostro-caudal. Este punto, situado inmediatamente lateral a la parte más dorsal de la mácula del sáculo, correspondería con el punto más central de la placoda ótica y el punto más ventral del eje dorso-ventral del oído interno.

-----▶

Figura 27. Mapa de destino dorsal-ventral (A-O) y rostral-caudal (J-P) de la placoda ótica. (A) Esquema de un embrión de estadio HH10 en donde se representa el trasplante de la mitad dorsal de la placoda ótica. (C-H) Secciones horizontales a través de un oído interno quimera de estadio E6. El trasplante forma una banda dorso-ventral en la cara medial del oído interno. Las células de codorniz se observaron en todo el sistema endolinfático (se; B) y en la pared medial del vestíbulo, aproximándose hacia la cresta anterior y posterior, pero sin llegar a contactar con ellas (ca y cp en C y D). En el conducto coclear, el trasplante fue detectado en toda la mácula del utrículo, mácula del sáculo, papila basilar, mácula de la lagena y la mitad medial de la mácula neglecta (ver mu, ms, pb, ml y mn en E-H). (I) Esquema tridimensional resumen del oído interno quimera de estadio E6. (J) Esquema de un embrión de estadio HH10 representando el trasplante de la mitad caudal de la placoda ótica. (K-O) Secciones horizontales a través del oído interno de estadio E6. Las células de codorniz fueron observadas en la pared posterior del sistema endolinfático y la bolsa vertical (K), incluyendo a la cresta posterior y la mácula de la lagena (L,M). En el conducto coclear, más de la mitad dorsal estaba marcado por el anticuerpo QCPN, conteniendo el trasplante a toda la papila basilar y la mácula de la lagena (N,O). (P) Esquema tridimensional resumene del oído interno quimera de estadio E6 con un trasplante de la mitad caudal de la placoda ótica. El punto azul en A y J representa el punto más central de la placoda ótica. El punto azul en I y P representa el punto más ventral del eje dorso-ventral del oído interno. Orientación: D, dorsal; M, medial; P, posterior; R, rostral. La barra de aumentos en K indica con 60 μ m (aplicado a B-H, K-O).



7. Agrupaciones transversales y longitudinales de los trasplantes realizados en la placoda ótica

A continuación, y como un ejercicio de análisis global, hemos agrupado los tres tipos de trasplantes realizados en el ectodermo enfrentado a cada rombómero. Dicho de otra manera, si consideramos solamente los trasplantes tipo 3 del ectodermo enfrentado a cada rombómero, la placoda ótica de un embrión de estadio HH10 (10 somitas) quedaría dividida en 4 dominios (Fig. 28A). De esta forma tendríamos un dominio anterior (azul, r4), un dominio posterior (naranja, r7) y dos dominios intermedios, de los cuales el dominio correspondiente al r5 (rojo) sería más rostral que el correspondiente al r6 (verde). Del mismo modo, si extrapolamos estos cuatro dominios al oído interno de estadio HH29 (E6), podemos identificar que estructuras sensoriales y no sensoriales del oído interno adulto se van a originar de cada uno de estos dominios (Fig. 28B). Por lo tanto, del dominio más rostral (r4) se van a originar la porción antero-lateral del sistema endolinfático, la mitad medial de la cresta anterior, toda la mácula del utrículo y un poco del territorio más dorsal de la mácula del sáculo (azul en Fig. 28A,B).

El dominio correspondiente al r5 (intermedio más rostral, rojo) dará lugar a la mitad antero-medial del sistema endolinfático, la pared anterior de la bolsa vertical, la mitad lateral de la cresta anterior, toda la bolsa horizontal, incluida la cresta lateral, prácticamente toda la mácula del sáculo y aproximadamente el tercio dorsal de la papila basilar y de la pared anterior del conducto coclear (rojo en Fig. 28A,B). En el dominio intermedio más caudal (r6, verde) se forma casi toda la pared posterior del sistema endolinfático, la pared posterior de la bolsa vertical, incluyendo a toda la cresta posterior y la mitad ventral de la mácula neglecta y prácticamente todo el conducto coclear (exceptuando la porción que se originaba del dominio correspondiente al r5, rojo). Incluye, además, a los dos tercios ventrales de la papila basilar y toda la mácula de la lagena (verde en Fig. 28A,B).

El dominio posterior, correspondiente al ectodermo enfrentado al r7, es el que menos aporta al oído interno (1/2 r7; naranja). Este dominio da una estrecha franja dorso-ventral en la pared postero-lateral del sistema endolinfático, además de una pequeña porción de la pared posterior del vestíbulo, en la que se incluye la mitad dorsal de la mácula de la lagena (naranja en Fig. 28A,B).



Por otro lado, si las diferentes porciones consideradas las agrupamos longitudinalmente, obtendríamos tres dominios diferentes. Un dominio dorsal (rosa), un dominio intermedio (azul) y un dominio ventral (amarillo) (Fig. 28C). Si extrapolamos cada uno de estos dominios a un oído interno de estadio E6, podríamos saber que estructuras tanto sensoriales como no sensoriales tienen un origen dorsal, ventral, o intermedio (Fig. 28D). Por lo tanto, del dominio más dorsal se origina: todo el sistema endolinfático, la porción medial del vestíbulo donde se inserta el sistema endolinfático, así como una pequeña porción de la pared anterior del vestíbulo, tocando dorsalmente a la mácula del utrículo. También el dominio más dorsal forma una banda dorso-ventral en el conducto coclear, tocando la porción medial de la mácula del sáculo y la papila basilar, así como una pequeña parte dorsal de la mácula de la lagena (rosa en Fig. 28C,D).

El dominio más ventral dará lugar a toda la bolsa vertical y bolsa horizontal, incluyendo a la cresta anterior, cresta lateral y la mitad lateral de la cresta posterior. Además, forma una banda dorso-ventral por la pared lateral del conducto coclear (amarillo en Fig. 28C,D).

Por último, el dominio intermedio (azul) alberga a la gran mayoría de los elementos sensoriales. Dicho dominio forma una banda dorso-ventral, tanto por la pared anterior como por la pared posterior del conducto coclear, incluyendo prácticamente toda la mácula del sáculo, papila basilar y mácula de la lagena, así como toda la mácula neglecta y la mitad medial de la cresta posterior (azul en Fig. 28C,D).

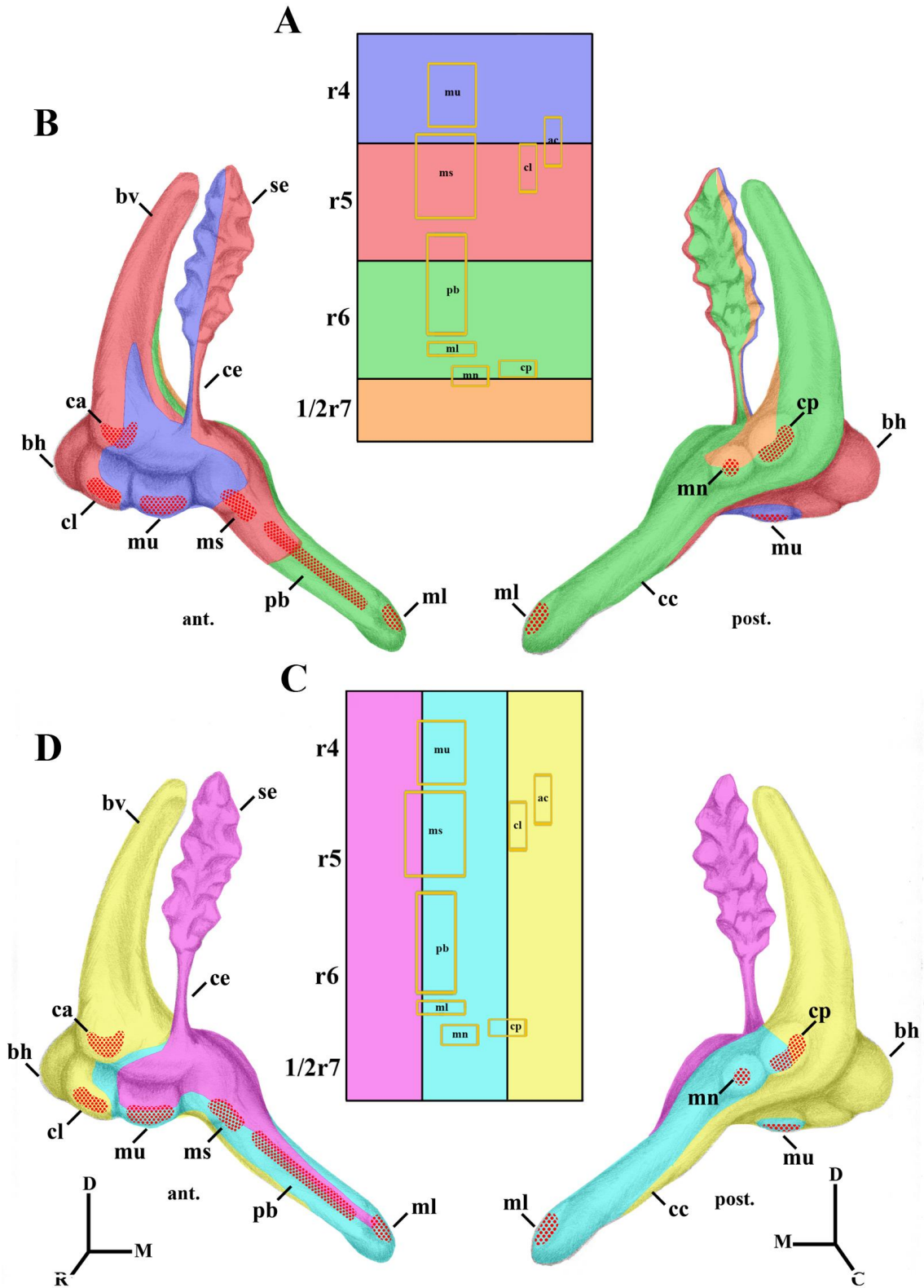


Figura 28. (A,C) Esquema de un embrión de estadio HH10, en el cual se representan las agrupaciones de las porciones consideradas en el mapa de destino. En A se obtienen 4 dominios transversales, mientras que en B se muestra 3 dominios longitudinales. Sobre dicho esquema se representan los distintos elementos sensoriales del oído interno. (B,D) Esquema tridimensional del oído interno de estadio E6 en el que se ha extrapolado los 4 dominios transversales (B) y los 3 dominios longitudinales (D).



8. Inyecciones de DiI

Una vez realizado el mapa de destino y conociendo la posición de las diferentes estructuras dentro del ectodermo cefálico, nos surgió la duda de si todo el territorio trasplantado pertenecía realmente a la placoda ótica. Entonces, nos propusimos afinar un poco más con la intención de encontrar los verdaderos bordes de dicha placoda ótica. Para ello, realizamos inyecciones de DiI (marcador fluorescente) alrededor de las zonas trasplantadas en embriones de estadio HH10. Se marcó un número reducido de células, lo cual nos permitía conocer la posición de estas células al día siguiente.

Comenzamos realizando inyecciones desde las zonas más externas de los trasplantes hacia el interior, hasta que dimos con el límite de la placoda ótica (Fig. 29A). En inyecciones realizadas en el r3 no encontramos células marcadas dentro del epitelio ótico al día siguiente. Inyecciones en el borde rostral del r4, algunas células se observan dentro del epitelio ótico en su porción más ventral (Fig. 29B), la porción más dorsal necesita más inyecciones para comprobar si pertenece al territorio de la placoda ótica. En la parte medial, parece que el límite dorsal se encuentra en el borde que representa el tubo neural a nivel de r4 y r5, mientras que se solapa un poco en la zona de r6 (comparar las Fig. 29D,F,J, dentro; y la Fig. 29E, fuera). También hay que tener en cuenta que el RC es algo más ancho que los r4 y r5.

La parte ventral de la placoda ótica no se extiende hasta el borde del embrión como podríamos creer, si no que ocupa un territorio algo más reducido sin alcanzar el borde del embrión. Inyecciones en esta porción nos permiten localizar el borde ventral de la placoda ótica (comparar Fig. 29B,C,K, dentro; y Fig. 29L,M, fuera). Con respecto al borde caudal, los resultados obtenidos de la realización de los trasplantes homotópicos nos llevó a poner el límite caudal de la placoda en la mitad del r7. Las inyecciones de DiI nos han permitido analizar con más detalle esta porción de la placoda ótica y viendo que al menos la porción más rostral del r7 se encuentra dentro de la placoda ótica.

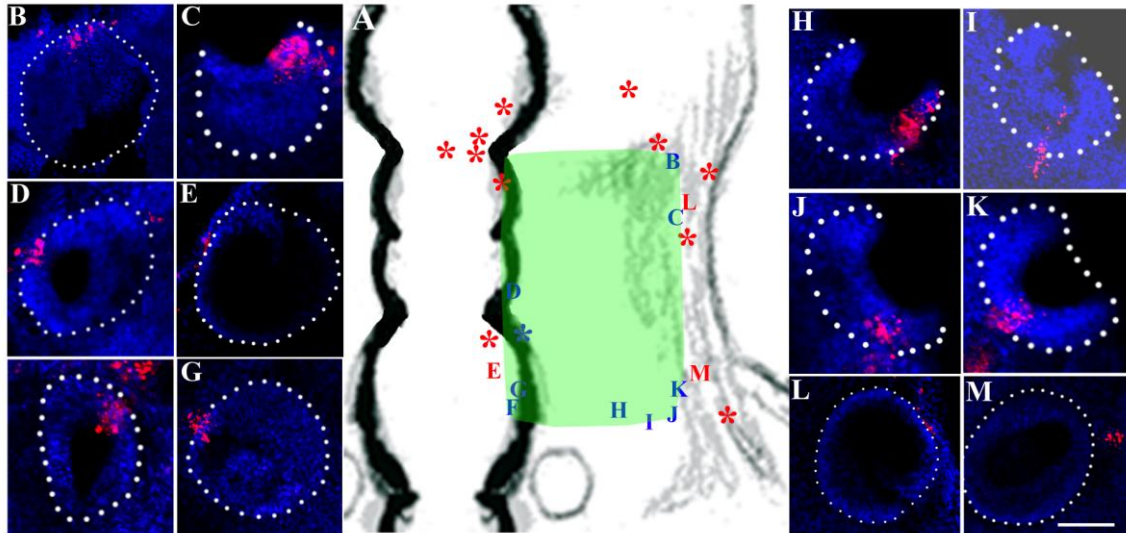


Figura 29. Estudio de los bordes de la placoda ótica en un embrión de 10 somitas con el uso de inyecciones de DiI. (A) Muestra un esquema de la placoda ótica de un embrión de estadio HH10, donde se han representado las diferentes inyecciones realizadas,. El color azul indica dentro y el color rojo indica fuera. (B-M) Se muestran las células marcadas dentro y fuera de la copa ótica de los embriones, la localización de la inyección en el embrión de 10 somitas se representa con cada letra en A. Ver que en las imágenes B-D,G-K, las inyecciones se encuentran dentro del territorio de la placoda ótica, mientras que las inyecciones de E,L,M, se encuentran fuera de dicho territorio. La barra de aumentos en M indica 26 μm (aplicado a B-M).

DISCUSIÓN

1. Origen del desarrollo del sistema endolinfático

El estudio del mapa de destino llevado a cabo en este trabajo muestra que toda la porción dorsal de la placoda ótica dará lugar al sistema endolinfático. Es interesante indicar que la porción más dorsal de la placoda ótica de pollo está en estrecho contacto con el rombencéfalo, estando ausente la lámina basal en ambos epitelios (Mayordomo *et al.*, 1998). Cada porción del ectodermo cefálico enfrentado específicamente a cada rombómero contribuye a una parte bien definida del sistema endolinfático, sin que se produzca una mezcla de células, sugiriendo la existencia de límites de restricción en dicho sistema. La existencia de subdivisiones en el conducto y saco endolinfático concuerdan con las observaciones llevadas a cabo en el estadio de copa ótica por el grupo de Fekete, usando inyecciones de DiI (Brigande *et al.*, 2000a,b; ver también Fekete y Wu, 2002). Según estos autores, un límite de restricción antero-posterior podría dividir el sistema endolinfático en dos mitades, anterior y posterior, con dos identidades diferentes (Brigande *et al.*, 2000a). A partir de nuestros resultados, es tentativo proponer que al menos hay tres compartimentos, correspondientes con la placoda ótica enfrentada al r4, r5 y RC. Los dominios observados en la placoda ótica podrían probablemente estar regulados por señales difusibles desde el rombencéfalo ya regionalizado.

2. Origen de todas las máculas y la papila basilar

En el desarrollo del oído interno de aves, el origen de los diferentes epitelios sensoriales fue analizado en los estadios de placoda y copa ótica, entre HH10 y HH17, usando inyecciones de DiI y DiO (Bell *et al.*, 2008). Los precursores de las máculas del utrículo y sáculo fueron agrupados en la parte antero-medial de la placoda ótica, mientras que los precursores de la papila basilar fueron localizados con mayor frecuencia en su parte postero-medial. La mácula de la lagena y la mácula neglecta no fueron consideradas en ese estudio (Bell *et al.*, 2008).

Nuestro trabajo, realizado exactamente en estadio de placoda ótica (10 somitas, HH10) y usando el modelo de pollo/codorniz como una aproximación experimental más fina, confirman en parte estas observaciones, añadiendo muchos más detalles. Las máculas se originan a partir de una banda antero-posterior situada justamente ventral al dominio presuntivo del sistema endolinfático. En ratón, recientes mapas de destino



usando marcadores genéticos de poblaciones del tubo neural han mostrado que células del tubo neural invaden el epitelio del esbozo ótico después de que haya ocurrido la inducción de la placoda (Freyer *et al.*, 2011). Así, las células teñidas *Pax3^{cre7+}* y *Wnt1-Cre* fueron observadas en la mácula del utrículo, mácula del sáculo y órgano de Corti, pero no en las crestas. Este reclutamiento de células se explica ahora perfectamente al mostrar la gran proximidad del origen de las máculas, así como el epitelio auditivo, al tubo neural (este trabajo).

Por lo tanto, en la placoda ótica de aves existiría un territorio pan-macular. Este dominio antero-posterior podría subdividirse conforme avanza el desarrollo embrionario en varias porciones que corresponderían con las máculas definitivas del oído interno adulto. Señales procedentes del rombencéfalo o incluso del propio sistema endolinfático en desarrollo podrían controlar estos eventos. De esta manera, la mácula del utrículo se originaría exclusivamente del ectodermo cefálico enfrenteado al r4, la mácula del sáculo se formaría mayoritariamente en el ectodermo cercano al r5, la mácula de la lagena surgiría del ectodermo enfrenteado al r6 y, por último, la mácula neglecta tendría su origen en una porción del ectodermo a caballo entre el ectodermo adyacente al r6 y r7. Por otra parte, distintas señales procedentes de otras estructuras embrionarias podrían determinar el desarrollo de la mácula más anterior (la mácula utricular) respecto de las máculas más caudales (mácula de la lagena y mácula neglecta). Así, señales procedentes de una porción del embrión rostral al r3, aun desconocidas, podrían mediar la diferenciación de las porciones más rostrales, mientras que señales procedentes de los somitas, por ejemplo de la vía del ácido retinoico, podrían controlar el desarrollo de las máculas más caudales.

En este sentido, habría que indicar que la papila basilar estaría incluida en este dominio antero-posterior. Ha sido propuesto que la papila basilar se originaría a partir de la mácula del sáculo, tal y como se observó al analizar la expresión del gen *Fgf10* (ver Capítulo 1). Señales procedentes de los r5 y r6 podrían determinar la aparición y desarrollo de estas dos estructuras sensoriales.

3. Origen de las crestas y los canales semicirculares

Los mapas de destino previos, usando DiI/DiO, han sugerido que los precursores de las crestas anterior y lateral se encuentran situadas en una porción anterior y lateral de la placoda/copa ótica, los precursores de la cresta anterior mostrando una mayor dispersión. Por otro lado, los precursores de la cresta posterior parecen estar situados en una porción posterior de la placoda ótica (Bell *et al.*, 2008). El origen de las dos crestas anterior/lateral en la parte anterior de la placoda ótica y la cresta posterior en la porción posterior fue coincidente con los estudios de Brigande y colaboradores (2000a). Nuestros resultados muestran una ubicación mucho más precisa del territorio presuntivo de las crestas en la placoda ótica de aves. Las crestas y los canales semicirculares se originarían en un dominio antero-posterior situado en la porción más ventral de la placoda ótica, justo adyacente al dominio pan-macular señalado anteriormente.

Mapas de destino realizados previamente no indicaron ningún tipo de subdivisión en la porción ventral del esbozo ótico, tanto en el estadio de placoda como en el de copa ótica (Brigande *et al.*, 2000). A partir de nuestros resultados, podemos afirmar que, en la placoda ótica, existirían al menos dos porciones: un anterior, que daría lugar a la cresta anterior y lateral, así como a sus canales semicirculares, y otra posterior, de donde se originaría la cresta posterior y el canal semicircular correspondiente. Señales procedentes muy probablemente de los arcos branquiales, segundo y tercero, podrían regular la diferenciación y desarrollo de estas estructuras sensoriales.

4. Restricción de la migración celular en el desarrollo del oído interno

En *Xenopus*, los mapas de destino previos realizados en los estadios de placoda ótica y otocisto, usando inyecciones de DiI en uno de los cuatro cuadrantes considerados y haciendo un seguimiento mediante *time-lapse*, han sugerido que existe una extensa mezcla de células en todo el epitelio ótico (Kil y Collazo, 2000). Así, una misma porción de la placoda ótica y el otocisto de *Xenopus* podría dar lugar a varios epitelios sensoriales, con importantes movimientos y una relevante mezcla de células, todo ello sin restricción en un compartimento anterior o posterior (Kil y Collazo, 2000). En el desarrollo del oído interno de ratón, una posible migración desde estructuras dorsales a ventrales ha sido también sugerida (Riccomagno *et al.*, 2005), confirmando la



idea de una posible mezclanza celular en las primeras etapas de la morfogénesis del oído interno. Sin embargo otros estudios en ratón han mostrado que, en estadios posteriores al otocisto, los órganos sensoriales anterior y posterior están restringidos a la mitad anterior y posterior del otocisto, respectivamente (Li *et al.*, 1978). Por lo tanto, la hipótesis de posibles migraciones celulares en el desarrollo del epitelio ótico, al menos de mamíferos, debería ser revisada.

En el otocisto, ha sido propuesto que la localización de los diferentes tipos de progenitores celulares (neuroblastos, progenitores de células ciliadas/soporte, progenitores no sensoriales) está muy restringida (Lang y Fekete, 2001), todo ello de acuerdo con lo sugerido por el modelo de los compartimentos limitados (Brigande *et al.*, 2000b). En este sentido, ha sido sugerida una segregación parcial de los precursores en la placoda ótica de pollo, usando para ello inyecciones de DiI/DiO: los precursores para los órganos sensoriales vestibulares, así como para las neuronas vestibulares, estarían localizados en la porción antero-lateral de la placoda ótica, mientras que los precursores para las neuronas y órgano sensorial auditivo están restringidos a la porción postero-medial (Bell *et al.*, 2008). Además infecciones virales en estadios de copa ótica en pollo han mostrado la restricción de números clones en una única subdivisión anatómica, confirmando un límite de dispersión clonal en el desarrollo del oído interno de pollo (Satoh y Fekete, 2005). Sin embargo, la hipótesis de un linaje de restricción no ha sido confirmada finalmente por estudios experimentales.

En nuestros trabajos de mapa de destino de la placoda ótica de aves, hemos demostrado que, sin lugar a dudas, las células de cada porción trasplantado nunca se entremezclan. Una vez que la placoda ótica se ha definido respecto al resto de las placodas craneales, y no antes (Streit, 2002), cada epitelio sensorial y no sensorial del oído interno de aves surgen de una porción muy pequeña de la placoda ótica, con una gran restricción de precursores en ellas (este estudio). Por lo tanto, el movimiento celular, y la consecuente mezcla de células, no parecen jugar un papel clave en el oído interno, al menos de aves. Esta regionalización podría ser el primer evento en el desarrollo del oído interno, al menos de aves, pudiendo estar controlada por señales difusibles desde los tejidos próximos, especialmente el tubo neural. En este sentido, los límites que separan las unidades segmentarias del rombencéfalo se caracterizan por la expresión de *Fgf3* (M.H-S., datos sin publicar), sugiriendo que la vía de señalización de

los FGFs podría ser la responsable para definir algunos dominios dentro de la placoda ótica. En este caso, las señales mediadas por ephrin desde el rombencéfalo podrían también ser consideradas (Galle *et al.*, 1996; Manzanares *et al.*, 1996; Bergeman *et al.*, 2000).

Respecto a esta restricción clonal en el desarrollo del oído interno de pollo, solamente una excepción ha sido observada en nuestros trabajos. Justo en el borde proximal de la papila basilar y en la cercanía de la mácula del sáculo, un número muy reducido de células han sido observadas alejándose del epitelio trasplantado una cierta distancia (ver Fig. 23D). Esta última evidencia podría ser explicada por el hecho de que la papila basilar se adquiere muy tarde en la evolución del oído interno de vertebrados (ver Capítulo 1). En el oído interno de pollo, la mácula del sáculo y la papila basilar son las últimas en especificarse (separarse), surgiendo desde un dominio dorso-ventral *Fgf10* positivo claramente observado en E8, y segregado en E9 (Sánchez-Guardado *et al.*, 2012). Además, esta zona corresponde al punto más central de la placoda ótica, tal y como se ha visto al determinar sus mitades antero-posteriores y dorso-ventrales (ver Fig. 26). Posibles cambios morfogenéticos intensos en esta zona o bien el efecto localizado de señales del propio epitelio podrían justificar estas observaciones.

5. Conclusiones remarcables

Este exhaustivo mapa de destino de la placoda ótica de embriones de ave podría ayudarnos a entender mejor algunos aspectos del desarrollo del oído interno de vertebrados, por ejemplo: (1) cómo las diferentes moléculas de señalización difusibles desde los tejidos cercanos, en particular procedentes del tubo neural, podrían estar implicadas en la especificación temprana de cada elemento sensorial y no sensorial del oído interno en desarrollo; (2) cómo los límites de la expresión asimétrica de diferentes genes reguladores, y especialmente de las moléculas de adhesión celular, pudieran coincidir con las delimitaciones de la placoda ótica obtenidas en nuestro mapa de destino; (3) y cómo estos límites regionalizarían el esbozo ótico durante su desarrollo, proporcionando identidades posicionales para la correcta especificación de todos los componentes del oído interno, probablemente según el modelo de los compartimentos (Brigande *et al.*, 2000b; Fekete y Wu, 2002). Además, (4) este mapa de destino de la placoda ótica de pollo podría ayudar a evaluar de nuevo algunos de los resultados descriptivos y experimentales previamente realizados, al situarlos en un nuevo contexto



conceptual. Además, (5) este mapa de destino podría ser también útil para entender mejor las diferencias entre la gran variedad de oídos internos a lo largo de la evolución de vertebrados. Nuevas interpretaciones de patrones de expresión génicos podrían sugerir nuevos estudios experimentales innovadores, todo ello orientado a conocer los mecanismos moleculares y celulares implicados en la especificación de las estructuras auditivas y vestibulares durante el desarrollo ontogenético y filogenético del oído interno de vertebrados.

CONCLUSIONES

Del análisis exhaustivo de este detallado mapa de destino de la placoda ótica de aves, realizado mediante los embriones quimera pollo/codorniz, se han obtenido las siguientes conclusiones:

PRIMERA – La extensión de la placoda ótica en embriones de estadio HH10 (10 somitas) va desde el ectodermo enfrentado al rombómero 4 hasta el ectodermo enfrentado a la mitad caudal del pro-rombómero C (rombómero 7).

SEGUNDA – La porción más dorsal de la placoda ótica dará lugar al sistema endolinfático, la porción más ventral a los canales semicirculares y crestas asociadas, y de la parte intermedia se formaran el vestíbulo y conducto coclear, así como el resto de los elementos sensoriales.

TERCERA – La cresta lateral y mácula neglecta, las cuales se generarían *de novo* durante el desarrollo evolutivo, se originan en territorios cercanos a la cresta anterior y la cresta posterior, respectivamente.

CUARTA – Topológicamente el elemento sensorial mas anterior es la mácula del utrículo. Sin embargo, desde el punto de vista topográfico, el elemento sensorial más anterior es la cresta anterior. Por el contrario, el elemento más posterior desde el punto de vista topológico es la mácula neglecta, y topográficamente es la mácula neglecta.

CAPÍTULO 3

ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES AFERENTES DURANTE EL DESARROLLO DEL OÍDO INTERNO DE AVES

INTRODUCCIÓN

El oído interno es capaz de detectar las aceleraciones lineares y angulares de la cabeza, así como el sonido (ver Introducción General). Las células ciliadas traducen los movimientos de sus esterocilios en señales eléctricas, las cuales activan a las neuronas del ganglio acústico-vestibular (GAV). De este modo, los estímulos sensoriales son transmitidos desde las células ciliadas, localizadas en los órganos sensoriales, a los núcleos sensoriales correspondientes en el cerebro posterior o rombencéfalo.

El oído interno se conecta con el rombencéfalo por medio de dos tipos de fibras. Las fibras aferentes son generadas por las neuronas del GAV. Estudios anatómicos indican que todas estas neuronas son pseudopolares, con una prolongación dirigida hacia un elemento sensorial concreto (dendrita) y la otra prolongación hacia el cerebro posterior (axón), conectando así ambas estructuras (Retzius, 1893; Perkins y Morest, 1975; Whitehead y Morest, 1985; Hemond y Morest, 1991). Por otra parte, los elementos sensoriales del oído interno están inervados por fibras procedentes de núcleos rombencefálicos, fibras eferentes. El sistema eferente recibe información de la vía sensorial ascendente del rombencéfalo y proyecta, entre otros, a los mecano-receptores (células ciliadas) del oído interno, modulando su acción (Simmons, 2002).

La inervación aferente de los elementos sensoriales del oído interno es llevada a cabo por las neuronas del GAV. Los componentes de este ganglio tienen un origen mixto. Por una parte, las células gliales proceden de las crestas neurales (Wikström y Anniko, 1987; Hemond y Morest, 1991), mientras que las neuronas del GAV se originan de neuroblastos desprendidos del epitelio ótico (Álvarez *et al.*, 1989; Álvarez y Navascués, 1990; Hemond y Morest, 1991; revisado por Alsina *et al.*, 2003).

Los precursores neuronales del GAV son el primer tipo celular que se diferencia en el epitelio ótico (D'Amico-Martel y Noden, 1983; Hemond y Morest, 1991; Fekete y Wu, 2002). El desarrollo de las neuroblastos en neuronas sigue un proceso secuencial: (1) especificación del precursor neuronal; (2) migración de los neuroblastos desde el epitelio ótico al mesénquima subyacente; (3) proliferación de los neuroblastos en el ganglio acústico-vestibular formado; y (4) finalmente, diferenciación en neuronas que inervan los elementos sensoriales del oído interno, además de emitir sus proyecciones también a los núcleos cocleares y vestibulares del rombencéfalo (Rubel y Fritzsch, 2002; Alsina *et al.*, 2003). No hay evidencias de que las dos poblaciones neuronales que conforman el GAV (GV, ganglio vestibular; GA, ganglio acústico) deriven de dos



precursores celulares diferentes, pero queda abierta la posibilidad de que deriven de diferentes compartimentos del epitelio ótico, segregándose temprano durante la gangliogénesis (Fekete y Wu, 2002). Por lo tanto, los objetivos de numerosas investigaciones recientes se centran en entender cómo se determina la región del epitelio ótico que genera las diferentes subpoblaciones de neuroblastos, además de conocer cómo se establece las conexiones ordenadas entre estos neuroblastos y los diferentes elementos sensoriales (revisado por Fekete y Campero, 2007).

Los estudios que se conocen sobre el proceso de innervación del epitelio ótico en el embrión de pollo son escasos (revisado por Rubel y Frizsch, 2002; Fekete y Campero, 2007). El conocimiento de las bases moleculares y celulares que regulan la diferenciación de los neuroblastos, así como la comprensión de los mecanismos implicados en el crecimiento dirigido de los axones/dendritas de las neuronas ganglionares, es clave para entender la innervación de los elementos sensoriales del oído interno en desarrollo (ver la Introducción General).

1. Origen y diferenciación de los neuroblastos

En el desarrollo del oído interno de pollo, la especificación de los neuroblastos empieza en estadios de placoda ótica (HH10; E1,5). El inicio de la migración de estos neuroblastos hacia el mesénquima subyacente comienza en torno al segundo día de incubación (HH12-14; E2; Álvarez *et al.*, 1989; Hemond y Morest, 1991; Adam *et al.*, 1998). Los neuroblastos se desprenden del territorio antero-medial de la placoda/copa ótica, el denominado dominio pro-neural (Alsina *et al.*, 2004; Abelló *et al.*, 2007). En el estadio de vesícula ótica, los neuroblastos se originan de la pared antero-ventral del epitelio ótico (Noden y van de Water, 1986; Álvarez y Navascués, 1990; Hemond y Morest, 1991; Adam *et al.*, 1998), de un territorio delimitado por la expresión de los genes *Gbx2* y *Otx2*, y el cual expresa en parte el gen *Fgf8* (Hidalgo-Sánchez *et al.*, 2000). En aves, las primeras fibras de las neuronas del GAV crecen al tercer día de incubación (Whitehead y Morest, 1985) y la proliferación de las neuronas en el GAV, al menos las neuronas cocleares, ocurre entre el cuarto y séptimo día de incubación (D'Amico-Martel, 1982). En los siguientes días del desarrollo embrionario, las neuronas se diferencian y se segregan en el ganglio auditivo y vestibular, siendo las neuronas cocleares las que se diferencian más tarde (D'Amico-Martel, 1982). En este sentido, hay que tener en cuenta que el oído interno de aves presenta dos elementos vestibulares

adicionales respecto al oído interno de mamíferos: la mácula neglecta, situada en el vestíbulo y cerca de la cresta posterior, y la mácula de la lagena, situada en el extremo del conducto coclear. Las neuronas vestibulares que inervan a la mácula de la lagena se sitúan en la periferia del ganglio auditivo (ver Fekete y Campero, 2007). Por lo tanto, en aves no se da una segregación completa entre los dos componentes, auditivo y vestibular, del GAV. Por lo tanto, uno de los objetivos de los estudios en biología del desarrollo es conocer marcadores de las diferentes poblaciones de neuroblastos que constituyen el GAV.

Se ha descrito que las neuroblastos se originan de la porción pro-neural. Por lo tanto, los genes pro-neurales son críticos para el desarrollo de las neuronas del GAV. Entre ellos se encuentran los factores de transcripción *Ngn1*, *NeuroD* y *NeuroM* (bHLH). Para una correcta formación de los órganos sensoriales y de los primeros neuroblastos, sería necesaria la expresión de *Neurogenin 1* (*Ngn1*), ya que la ausencia de este gen no produce ni neuronas sensoriales ni células ciliadas (Ma *et al.*, 2000). El siguiente paso en la diferenciación de las primeras neuronas parece estar mediado por *NeuroD* y *NeuroM*, regulados a su vez por *Ngn1*, los cuales están implicados en ciertos aspectos de migración y guía axonal, así como en la supervivencia de las neuronas sensoriales (Liu *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001). Mutantes *knock-out* para estos factores de transcripción muestran una deficiente delaminación de los neuroblastos, produciendo así una reducción en el número de neuronas óticas (Ma *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Sánchez-Calderón *et al.*, 2007b). Por otra parte, el origen topológico de las primeras neuronas en el epitelio del otocisto ha sido identificado por la expresión del gen *Fgf19* (Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a).

Asimismo, se ha descrito que el factor de transcripción Islet1, perteneciente a la familia con homeodominio LIM (LIM-HD), es un factor clave en la diferenciación de los neuroblastos y la consiguiente formación del GAV (Adam *et al.*, 1998; Camarero *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Radde-Gallwitz *et al.*, 2004). Islet1 se detecta en gran parte del epitelio ótico de embriones de aves. Islet1 también se observada en algunas células de la región neurogénica, su expresión siendo más intensa en las células (neuroblastos) que ya se han desprendido del epitelio ótico (Adam *et al.*, 1998; Camarero *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Posteriormente, su expresión se mantiene en las neuronas diferenciadas del GAV (Radde-Gallwitz *et al.*, 2004).



Gata3 se expresa en el epitelio ótico, ciertas células del mesenquima periótico y neuronas del GAV (Karis *et al.*, 2001; Lawoko-Kerali *et al.*, 2004; Livellali *et al.*, 2004, 2006, 2007; Jones y Warchol, 2009). Algunos trabajos muestran que *Gata3* se expresa en neuroblastos mientras están dentro del epitelio ótico, durante su migración y una vez situados en el GAV (Lawoko-Kerali *et al.*, 2004). En este sentido, *Gata3* ha sido propuesto como un marcador exclusivo de los neuroblastos cocleares, mientras que la expresión de *NeuroD* marcaría la población de neuroblastos vestibulares, sugiriendo que en el epitelio ótico hay dos poblaciones de precursores neurogénicos separadas (Karis *et al.*, 2001; Lawoko-Kerali *et al.*, 2004; Jones y Warchol, 2009). No obstante, estas evidencias necesitan ser confirmadas (Lawoko-Kerali *et al.*, 2004; Jones y Warchol, 2009).

2. Origen y proyección de los neuroblastos: dos posibles hipótesis alternativas

El crecimiento de las fibras aferentes hacia el epitelio ótico, así como los mecanismos de conducción y guía axonal, han suscitado gran interés desde hace más de cien años. Las neuronas auditivas y vestibulares parecen presentar ambientes de guía estereotipados, indicando que las vías para la invasión de dianas específicas en el oído interno ocurre muy temprano durante los procesos de neurogénesis (Rubel y Fritzsch, 2002; Fekete y Campero, 2007; Koundakjian *et al.*, 2007). Los primeros trabajos indicaron que los axones vestibulares y cocleares, una vez que alcanzan el esbozo ótico, se desplazan sobre la lámina basal que delimita el epitelio otico antes de entrar en el epitelio ótico (Retzius, 1893; Ramon y Cajal, 1919; Lorente de No, 1926, 1933).

Observaciones en ratones han sugerido que las neuronas del ganglio coclear migran exclusivamente del propio epitelio coclear durante su desarrollo embrionario (Altman y Bayer, 1982). Carney y Silver (1983) mostraron que los neuroblastos emitirían sus prolongaciones poco después de iniciar su migración, mucho antes de alcanzar su posición definitiva en el GAV. El camino de migración celular podría ser el mismo que el de guía axonal. Imágenes de microscopía electrónica confirman que los neuroblastos y el cono de crecimiento comparten el mismo camino de migración (Carney y Silver, 1983). Los procesos de migración de los neuroblastos podrían servir como sustrato a los axones pioneros para encontrar su camino de vuelta a la porción del otocisto en donde se originan. Así, los neuroblastos proyectarían a la misma región de origen, manteniendo un correcto orden, en especial en el sistema auditivo (tonotopía)

(Carney y Silver, 1983). De esta manera, se evitaría la necesidad de señales difusibles que actuarían a larga distancia desde el epitelio ótico. Por otra parte, esta hipótesis obligaría a que todos y cada uno de los elementos sensoriales generen sus propios neuroblastos. Hasta el momento, no se han realizado experimentos para confirmar esta posibilidad.

Sin embargo, ha sido propuesto que las neuronas del GAV no derivan del mismo lugar del epitelio ótico al que van a innervar (Noden y van de Water, 1986). De esta manera, es muy probable que exista un parcial solapamiento, pero no total, entre la localización original de los neuroblastos y el destino final de las dendritas en los primordios sensoriales. Esta hipótesis está apoyada por las observaciones realizadas en aves, mostrando que los precursores de los neuroblastos vestibulares y auditivos podrían presentar un progenitor común. Estos progenitores acústico-vestibulares estarían situados en la parte más anterior de la vesícula ótica, especialmente dentro o adyacente a la mácula de utrículo (Satoh y Fekete, 2005). Los trabajos que analizan la expresión de neurotrofinas y *NeuroD* sugieren que estos precursores duales se originarían tanto de la mácula del utrículo como la del sáculo (Fritzsche *et al.*, 2002; Raft *et al.*, 2007). No obstante, no se descarta la posibilidad de que otros elementos sensoriales cercanos pudieran generar estos precursores comunes de neuroblastos. Todos estos resultados contradicen en parte la primera hipótesis planteada, abriendo la posibilidad de la existencia de señales difusibles a larga distancia que controlen el crecimiento y guía de las prolongaciones de los neuroblastos en desarrollo (ver Fekete y Campero, 2007).

3. Mecanismos de guía axonal en el desarrollo del oído interno

Ramón y Cajal propuso la existencia de factores neurotróficos difusibles originados en determinadas porciones del epitelio ótico, y que regularían la atracción y guía del cono de crecimiento de los axones pioneros (Ramón y Cajal, 1908), quizá por rutas previamente establecidas (Carney y Silver, 1983). El crecimiento de las prolongaciones de los neuroblastos diferenciándose en cultivo *in vitro* junto con porciones del epitelio ótico sugieren la existencia de señales difusibles neurotróficas (Hemond y Morest, 1992). Por ello, la liberación local de quimio-atrayentes desde el primordio sensorial podría servir como indicadores para la guía de las dendritas (Noden y van de Water, 1986; Rubel y Fritzsche, 2002). Sin embargo, se ha caracterizado el papel de las posibles fuentes de señalización que atraen o que repelen el crecimiento del



cono axónico hacia las células sensoriales para establecer las conexiones sinápticas adecuadas.

Una posibilidad es que sean las células ciliadas, presentes en los epitelios sensoriales en desarrollo, las que produjeran estos quimio-atrayentes y atraer así a las prolongaciones axónicas adecuadas. Genes de la familia de *Atho1* (por ejemplo *Cath1* y *Math1*) están implicados en la diferenciación de las células ciliadas (Bermingham *et al.*, 1999; Zheng y Gao, 2000; Chen *et al.*, 2002; Kawamoto *et al.*, 2003; Fritzsche *et al.*, 2005; Matei *et al.*, 2005; Pujades *et al.*, 2006; Millimaki *et al.*, 2007, 2010; ver también Schimmang, 2012). Expresión ectópica de *Atho1* en el epitelio ótico coclear genera una innervación adicional de estas nuevos territorios sensoriales (Zheng y Gao, 2000). Resultados similares se han observado al sobre-expresar Wnt/ β -catenina en el coclear y generando nuevos elementos sensoriales ectópicos (Stevens *et al.*, 2003). Por lo tanto, los elementos sensoriales podrían emitir neurotrofinas. No obstante, es interesante señalar que el epitelio del sistema endolinfático, el cual no presenta elementos sensoriales, muestra también un efecto quimio-atrayente hacia las prolongaciones de los neuroblastos (Hemond y Morest, 1992). Esta observación indica que el efecto quimio-atrayente podría no estar mediado exclusivamente por las células ciliadas. De hecho, los axones pioneros llegan al epitelio ótico, al menos de algunos elementos sensoriales, poco antes de la diferenciación de las células ciliadas (Whitehead y Morest, 1985). Además, mutaciones que eliminan la diferenciación de células ciliadas, por ejemplo de *Atho1* y *Brn3c*, no alteran el patrón de innervación del epitelio ótico (Xiang *et al.*, 2003; Fritzsche *et al.*, 2005). Por lo tanto, en este proceso de guía axonal, las células ciliadas serían suficientes, pero no necesarias (ver Fekete y Campero, 2007).

Las moléculas de la familia de la neurotrofinas son buenas candidatas como agente quimio-atrayentes. Es conocido que el epitelio ótico genera sustancias neurotróficas del tipo NGF, factores de crecimiento, entre ellos *BDNF* y *NT-3* (Ernfors *et al.*, 1995; Fritzsche *et al.*, 1995; Fariñas *et al.*, 2001). Ratones deficientes de *BDNF* y su receptor, *Trk B*, muestran una importante reducción del número de neuronas vestibulares y pérdida parcial de la innervación de ciertos elementos sensoriales, en especial las crestas. Ratones deficientes de *NT-3* y su receptor, *Trk C*, muestran deficiencias en neuronas del ganglio espiral, auditivas (Fritzsche *et al.*, 1997, Rubel y Fritzsche, 2002).

Estudios descriptivos y experimentales han mostrado la existencia de señales repelentes desde el epitelio ótico en desarrollo. Entre ellas, cabe destacar las Netrinas, Semaforinas, Eph/ephrinas y Slit/Robos, entre otras (Miyazaki *et al.*, 1999; Cowan *et al.*, 2000; Mukarami *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2002; Bianchi y Gray, 2002; Rubel y Fritzsche, 2002; Brors *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2003; Hackett *et al.*, 2007).

Además, varios morfógenos, tales como WNT, BMP y SHH (*Sonic Hedgehog*), podrían también estar implicados en la orientación de la trayectoria de los axones óticos en crecimiento (Webber y Raz, 2006; ver Fekete y Campero, 2007).

Aunque se han realizado importantes progresos en los últimos años, varias cuestiones primordiales continúan sin ser resueltas.

OBJETIVOS

Los precursores neuronales (neuroblastos) se desprenden del epitelio ótico para invadir el mesénquima subyacente, lugar en el que se van a diferenciar en neuronas sensoriales del ganglio acústico-vestibular (GAV). Estas neuronas van a inervar a las células ciliadas de todos los elementos sensoriales, tanto auditivos como vestibulares.

A pesar del interés suscitado por el lugar de origen de los precursores neuronales y la posterior inervación de las neuronas sensoriales, aun no está claro si existe una relación espacial entre el origen de los neuroblastos y el destino de sus proyecciones a los diferentes elementos sensoriales presentes en el laberinto membranoso del oído interno.

Por lo tanto, los objetivos de este capítulo se han centrado en:

1. Caracterizar la migración de los neuroblastos desde el epitelio ótico en diferentes etapas de su desarrollo, utilizando para ello los marcadores propuestos previamente en la bibliografía. Con este estudio sistemático y detallado, estableceremos un mapa de origen de las posibles subpoblaciones de neuroblastos.
2. Establecer un mapa de proyecciones de las subpoblaciones de neuroblastos según su origen. Para ello, trasplantaremos cada elemento sensorial por separado, o pequeñas porciones de algunos de ellos. Estos trasplantes se realizarán en el estadio de placoda ótica, según el mapa de destino de la placoda ótica (ver Capítulo 2). De esta manera, comprobaremos si la inervación de los distintos elementos sensoriales mantiene una relación topográfica origen-destino o no.
3. Confirmar si realmente existe una segregación espacial entre el ganglio acústico y el ganglio vestibular en cuanto al origen de sus neuroblastos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio experimental, igual que para la obtención del mapa de destino, se ha llevado a cabo mediante la técnica de trasplantes pollo/codorniz, la cual nos permite seguir un específico grupo de células (el trasplante) a lo largo del desarrollo embrionario, y determinar el destino prospectivo y localización del tejido trasplantado (Alvarado-Mallart y Sotelo, 1984; Hidalgo-Sánchez *et al.*, 1999).

En este caso, nos interesaba detectar las fibras aferentes (dendritas) de los precursores neuronales (neuroblastos) que se desprenden del epitelio ótico y que, tras su diferenciación en neuronas sensoriales de ganglio acústico-vestibular (GAV), inervan los diferentes elementos sensoriales presentes en el laberinto membranoso del oído interno. Para poder llevar a cabo este estudio, tuvimos que realizar algunas modificaciones a la metodología usada para los trasplantes del mapa de destino (Capítulo 2). Los trasplantes realizados en este estudio eran homotópicos pero solamente de ectodermo, sin tubo neural (Fig. 29A). No se trasplantó el tubo neural de la codorniz para evitar la posible contaminación de las muestras con fibras eferentes provenientes del rombencéfalo (Simmons, 2002). Dado que conocemos la localización de los diferentes elementos sensoriales en la placoda ótica, gracias al mapa de destino (Capítulo 2; Fig. 29B), los trasplantes fueron realizados intentando coger una porción pequeña del ectodermo (Fig. 29A) que tuviera solamente un elemento sensorial de manera independiente (Fig. 29B). Así mismo, estos trasplantes se realizaron también en estadio HH10, sabiendo que la delaminación de los neuroblastos comienza en estadios de copa otica (HH11-12) (Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a). El análisis de los embriones quimeras fue realizado en el estadio HH32-34 (8-9 días de desarrollo), cuando la delaminación y posterior inervación de los elementos sensoriales prácticamente ha finalizado.

La inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal QN-Mab (*quail-specific neuronal marker*), capaz de unirse exclusivamente a la membrana plasmática de las células de codorniz (Tanaka *et al.*, 1990). Este anticuerpo nos permite reconocer las fibras de las neuronas de codorniz, sin marcar las fibras de las neuronas del huésped (Fig. 30A-C). Comparando el marcaje obtenido con los anticuerpos QN (Fig. 30A-C) y 3A10 (Fig. 30D-F) en un oído interno de codorniz, observamos que ambos anticuerpos marcan todas las fibras que llegan al epitelio ótico. Por lo tanto, el anticuerpo QN es un buen marcador de las fibras óticas de las células de codorniz. Este anticuerpo nos



permite reconocer qué elementos sensoriales van a ser inervados por las neuronas del GAV que previamente se desprendieron como neuroblastos de la región trasplantada. Para conocer la disposición de las células de codorniz dentro del epitelio ótico del oído interno de codorniz, y con ello el origen de los neuroblastos, realizamos inmunohistoquímicas con el anticuerpo monoclonal anti-codorniz QCPN, al igual que para el mapa de destino (Fig. 30G). En el ejemplo mostrado, las células de codorniz se localizaron en la mitad lateral de la cresta posterior (Fig. 30G) y las fibras de las neuronas del GAV, originadas desde dicho trasplante, inervaron la mitad lateral de dicho elemento sensorial (Fig. 30H).

1. Detección del trasplante

La inmunohistoquímica con el anticuerpo QN fue llevada a cabo igual que se ha descrito para el anticuerpo QCPN (ver Capítulo 2). El anticuerpo QN fue usado a una dilución 1/10.

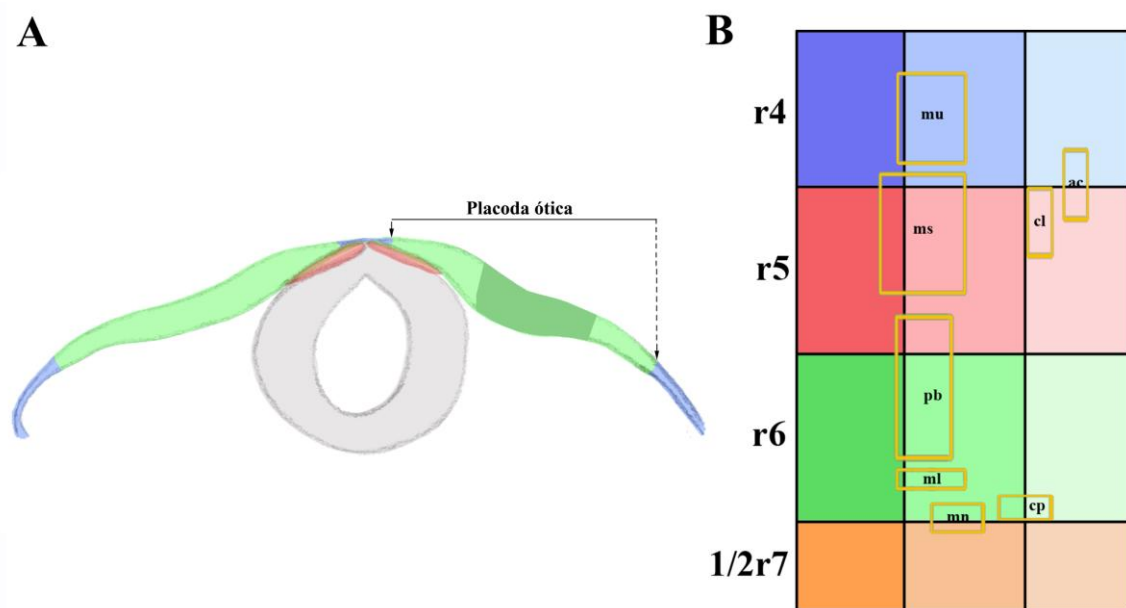


Figura 29. (A) Esquema de una sección transversal a través del embrión de pollo trasplantado en estadio HH10 (10 somitas), donde se representa la extensión dorso-ventral de la placoda en el ectodermo cefálico. El trasplante fue solamente de una porción del epitelio ótico (territorio verde oscuro dentro de la placoda). (B) Esquema de la placoda ótica en el que se representan mediante cuadros amarillos la disposición de cada elemento sensorial (ver Capítulo 2).

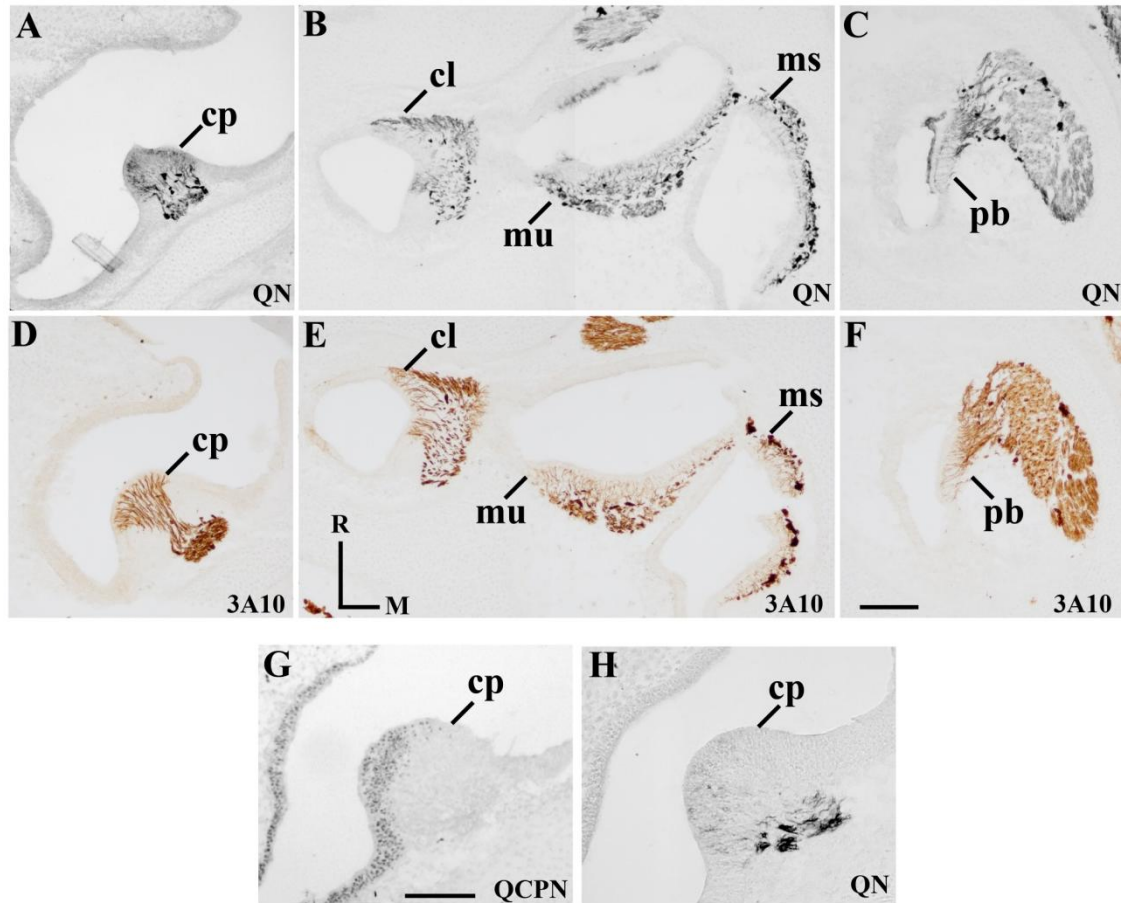


Figura 30. (A-F) Secciones horizontales a través del oído interno de codorniz, tratadas con los anticuerpos QN (A-C) y 3A10 (D-F). Ambos anticuerpos marcan por igual toda la población de fibras óticas. (G,H) Embrión quimera de 8 días de incubación, mostrado como ejemplo. Las células de codorniz, QCPN positivas, se localizan en la mitad lateral de la cresta posterior (G). Las dendritas procedentes de las neuronas que se han originado del territorio trasplantado, QN positivas, inervan a la cresta posterior (H). Orientación: D, dorsal; M, medial. La barra de aumentos en F indica 52 μ m (aplicado a A-F) y en H indica 38 μ m (aplicado a G,H).

2. Marcaje de neuroblastos

Para el marcaje de las diferentes poblaciones de neuroblastos del oído interno, hemos realizado hibridaciones *in situ* con los genes *Fgf10*, *Fgf19*, *Ngn1*, *NeuroD* y *NeuroM*, e inmunohitoquímicas con los anticuerpos GATA3 e Islet1. Tanto la hibridación *in situ* como la inmunohitoquímica fueron descritas en el Capítulo 1 (ver Materiales y Métodos), así como la información para obtener las sondas de los genes *Fgf10* y *Fgf19* (Tabla 1).

Para la obtención de las sondas de los genes *Ngn1*, *NeuroD* y *NeuroM*, se usaron las siguientes encimas:

Gen	Enzima de Restricción	Polimerasa	Referencia
Ngn1	EcoR1	T3	Alsina <i>et al.</i> , 2004
NeuroD	Not1	T3	Alsina <i>et al.</i> , 2004
NeuroM	Nco1	Sp6	Alsina <i>et al.</i> , 2004

Mientras que las inmunohistoquímicas con los anticuerpos GATA3 e Islet, fueron realizadas como se describe para el anticuerpo QCPN (Capítulo 2). Las diluciones a las que se usaron los anticuerpos fue: GATA3 dilución 1/100 e Islet1 dilución 1/100 (Jones y Warchol, 2009)

RESULTADOS

1. Patrón de expresión de *Fgf19* en estadios tempranos del desarrollo del oído interno

Se ha descrito que el gen *Fgf19* se expresa en el mesodermo paraxial cercano al esbozo del oído interno en estadios tempranos del desarrollo, y que está implicado en la inducción ótica (Ladher *et al.*, 2000). También, la expresión de *Fgf19* se detecta tanto en los neuroblastos ganglionares que se desprenden del epitelio de la copa ótica como en las neuronas del ganglio acústico-vestibular (GAV). La expresión de *Fgf19* se mantiene en el GAV hasta el octavo día de desarrollo, sugiriendo una relación entre este gen y la diferenciación neuronal (Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a).

Para caracterizar la distribución de los neuroblastos que se desprenden del epitelio ótico, hemos realizado un estudio detallado de la expresión del gen *Fgf19* entre los estadios HH14 y HH27. En secciones sagitales a través del esbozo ótico (copa ótica; estadio HH14, Fig. 31A-C), la expresión de *Fgf19* se observa de manera intensa en algunas células que están saliendo del epitelio ótico en su porción dorso-lateral, justamente ventral al borde anterior del poro ótico (po; cabeza de flecha en Fig. 31A). Secciones más mediales continúan mostrando algunos neuroblastos dispersos en la pared anterior del esbozo ótico, a nivel dorsal y ventral (cabezas de flecha en Fig. 31B,C). También notar que los neuroblastos que han dejado el epitelio ótico comienzan a congregarse en contacto con la pared anterior del esbozo ótico, empezando a formar el ganglio acústico-vestibular (asteriscos en Fig. 31B,C).

Secciones sagitales a través del epitelio ótico de estadio HH15 (Fig. 31D-F) continúan mostrando la expresión de *Fgf19* de manera intensa en neuroblastos que se están desprendiendo de la pared ótica rostral (entre cabezas de flecha en Fig. 31D-F). Resaltar que en las secciones más laterales se observa un mayor número de neuroblastos en la porción dorsal de la copa ótica (flecha en Fig. 31D), mientras que en secciones más mediales los neuroblastos se observan en regiones cada vez más ventrales (comparar flechas en Fig. 31D-E). El acúmulo de neuroblastos en el mesénquima subyacente se va haciendo cada vez más patente en la porción antero-ventral de la copa ótica, siendo mayor dicha congregación de neuroblastos en secciones más mediales (comparar asteriscos en Fig. 31D-F).



En el estadio HH16, cuando el poro ótico comienza a cerrarse para pasar de copa ótica a vesícula ótica, secciones sagitales a través del oído interno (Fig. 31G-I) muestran un mayor número de células que expresan *Fgf19* a nivel dorsal de la pared rostral del esbozo ótico que en estadios anteriores y en secciones laterales (entre cabezas de flecha en Fig. 31G). Como en el estadio anterior, secciones más mediales muestran la expresión de *Fgf19* en neuroblastos que están dejando el epitelio ótico en la pared anterior, pero a niveles más ventrales (entre cabezas de flecha en Fig. 31H,I). También se puede observar como los neuroblastos van formando el GAV (asteriscos en Fig. 31H,I).

Finalmente, realizamos el estudio de la expresión del gen *Fgf19* en el oído interno de estadio de vesícula ótica (HH17; secciones sagitales Fig. 31J-L; secciones transversales Fig. 31M-Q). En secciones sagitales, se corrobora la migración de los neuroblastos desde el epitelio ótico en la pared anterior, a nivel dorsal en secciones laterales (no mostrado) y a nivel ventral en secciones mediales (entre cabezas de flecha en Fig. 31J-L). Resaltar que en este estadio se empiezan a observar algunos neuroblastos marcados por el gen *Fgf19* en la pared posterior del esbozo ótico, solamente en las secciones más mediales (flecha en Fig. 31L). En las secciones transversales de estadio HH17, la expresión de *Fgf19* se observa desde la pared anterior hasta la pared posterior de la vesícula ótica, formando una banda antero-posterior y ventro-medial, similar al dominio pan-sensorial descrito para la expresión del gen *Fgf10* en estadio HH18 (ver Capítulo1; comparar imágenes Fig. 31M-Q y Fig. 14A-E). Apremiar que existe un mayor número de neuroblastos *Fgf19* positivos en la porción anterior, y que dicho número va disminuyendo según avanzamos hacia la parte posterior de la vesícula ótica (comparar cabezas de flecha en Fig. 31M-Q). Según se avanza en el desarrollo, la cantidad de neuroblastos marcados con el gen *Fgf19* en el GAV es cada vez mayor (asteriscos en Fig. 31J-P). Por lo tanto, podemos concluir que la expresión de *Fgf19* en los estadios iniciales de la morfogénesis del oído interno de aves define muy bien el origen y migración de los neuroblastos desde el epitelio de la copa y vesícula ótica.

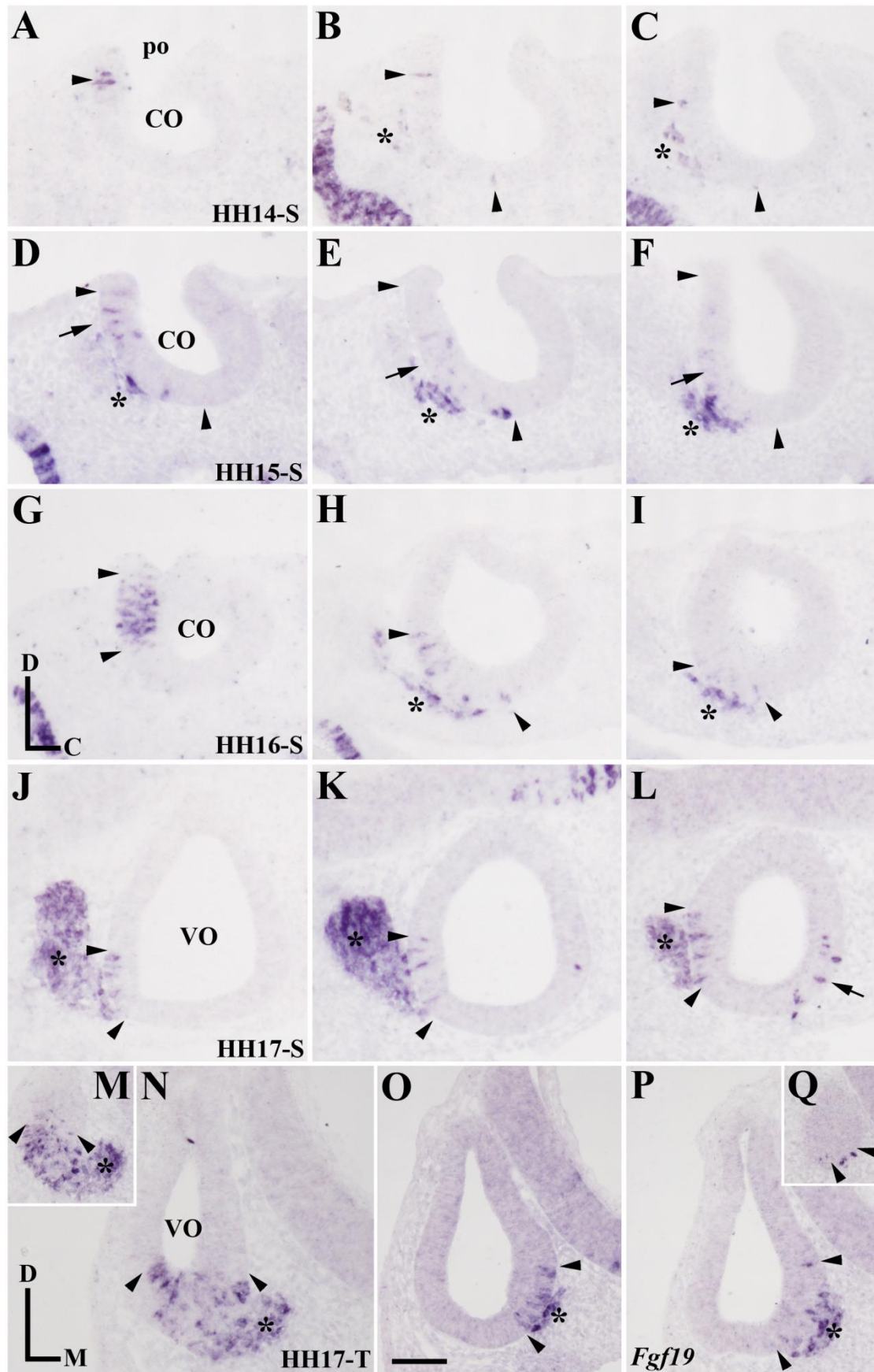




Figura 31. Patrón de expresión del gen *Fgf19* en diferentes estadios de desarrollo. **(A-B)** Secciones sagitales a través del epitelio ótico de estadio HH14 muestran la expresión de *Fgf19* en los neuroblastos que están migrando desde la pared anterior del epitelio ótico. **(D-F)** Secciones sagitales a través del esbozo ótico de estadio HH15. Las neuroblastos marcados por *Fgf19* se observan en la pared anterior de la copa ótica. **(G-I)** En secciones sagitales a través del epitelio ótico de estadio HH16, la expresión de *Fgf19* se hace patente en la pared anterior del esbozo ótico. **(J-L)** Secciones sagitales a través del epitelio ótico de estadio HH17. En este estadio, los neuroblastos marcados por *Fgf19* comienzan a observarse también en la pared posterior de la vesícula ótica. **(M-Q)** Secciones transversales a través de la vesícula ótica de estadio HH17. La expresión de *Fgf19* se aprecia formando un gradiente de expresión en una banda antero-posterior. Se observan un mayor número de células *Fgf19* positivas en la pared anterior que en la pared posterior de la vesícula ótica. Orientación: C, caudal; D, dorsal; M, medial. La barra de aumentos en O indica 25 μ m (aplicado a A-Q).

2. Neurogénesis en el estadio HH18-20

En el estadio HH18-20, secciones horizontales a través del oído interno muestran que la células *Fgf19* positivas se localizan en el epitelio ótico, en una región que se extiende desde la porción posterior a la porción anterior de la pared medial del esbozo ótico (entre cabezas de flecha en Fig. 32A-D). En el estadio HH18-20, la banda antero-posterior que forma la expresión de *Fgf19* se incluye dentro de la banda antero-posterior descrita para el gen *Fgf10* (comparar el marcaje de la hibridación *in situ* en Fig. 32A-D y Fig. 32E-H; ver también Fig. 14A-E), tal y como se vio en el estadio HH17 (Fig. 31). Resaltar que en el territorio de células *Fgf19* positivas se aprecia la mácula del utrículo en desarrollo, especialmente en el límite entre mácula del utrículo y cresta lateral (ver la expresión de otros genes ver Fig. 15; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012).

Además, se ha descrito que los neuroblastos que formarán el GAV se originan en una región del epitelio de la vesícula ótica conocida como dominio pro-neural, definido por la expresión de determinados genes pro-neurales. Entre dichos genes pro-neurales se encuentran: *Islet1*, *GATA3*, *Neurogenina1* (*Ngn1*), *NeuroD* y *NeuroM* (Alsina *et al.*, 2004; Sánchez-Calderón *et al.*, 2007b).

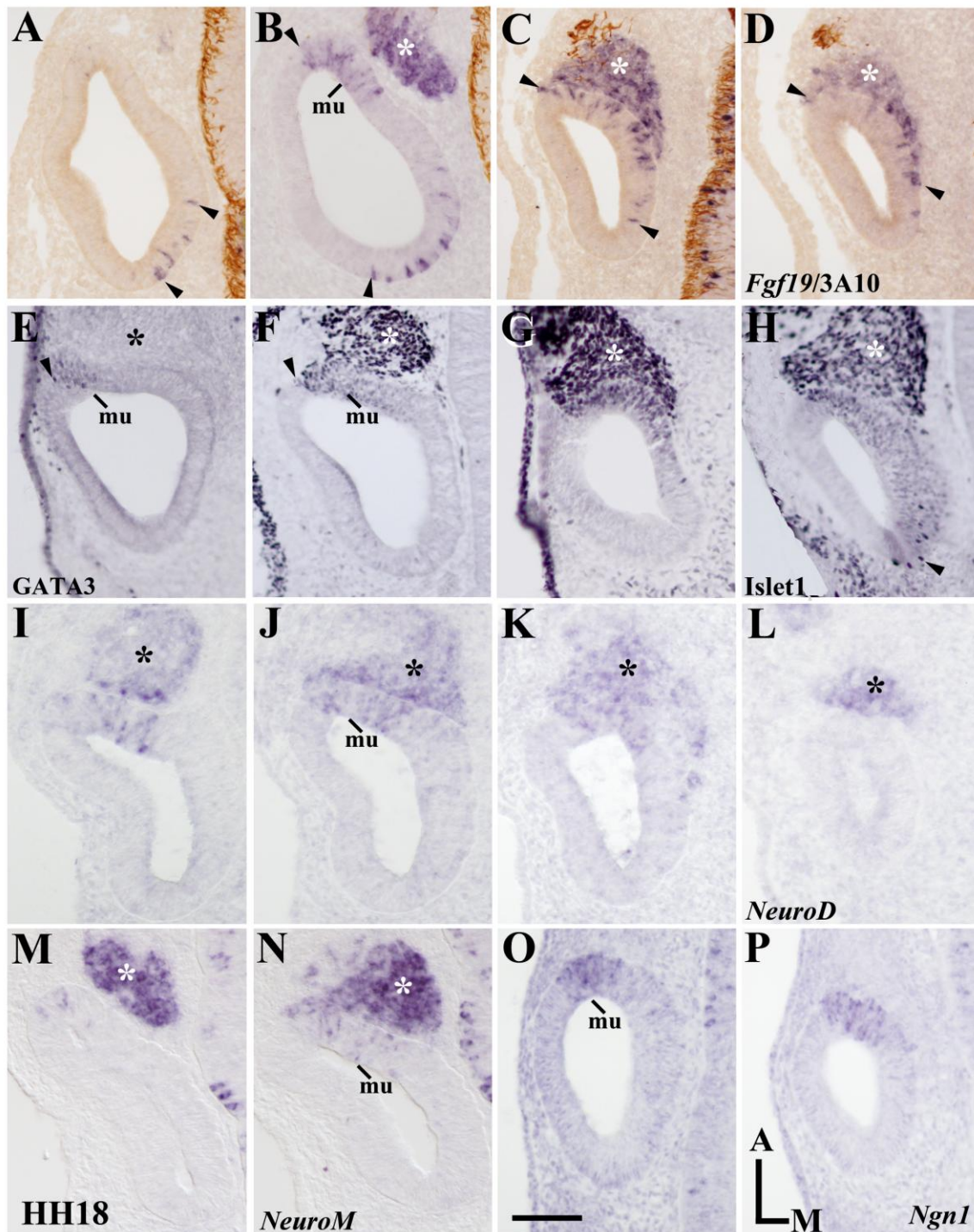
La expresión del anticuerpo GATA3 fue observada solamente la presuntiva mácula del utrículo, en el límite con la cresta lateral (cabeza de flecha en Fig. 32E). Además, no se observó ningún neuroblasto marcado por GATA3 en el GAV (asterisco en Fig.32E). Por el contrario el anticuerpo *Islet1* marca los neuroblastos que conforman

el GAV (asteriscos en Fig. 32F-H). También, se pueden apreciar algunos neuroblastos GATA3 positivos que se encuentran abandonando el epitelio ótico dentro del territorio pan-sensorial *Fgf10* positivo (cabezas de flecha en Fig. 32F,H).

Los factores de transcripción *Ngn1*, *NeuroD* y *NeuroM* (bHLH) se expresan en el dominio pro-neural del epitelio ótico (Alsina *et al.*, 2004). Además *NeuroD* y *NeuroM* se expresan en los neuroblastos que se han desprendido del epitelio ótico, sugiriendo que actúan posteriormente en la especificación de los precursores neuronales (Sánchez-Calderón *et al.*, 2007b). La expresión de estos genes pro-neurales fue detectada dentro de la banda pan-sensorial *Fgf10* positiva, observándose la expresión de dichos genes más intensa en la pared anterior del oído interno (Fig. 32I-N). Así, las expresiones de *NeuroD* y *NeuroM* se encuentran formando un gradiente rostro-caudal por la pared medial de la vesícula ótica, similar a *Fgf19* (Fig. 32A-D). Notar que la expresión de *NeuroD* es más extensa que la de *NeuroM* (comparar Fig. 32I-L con Fig. 32M,N). Tanto *NeuroD* como *NeuroM* se encuentran marcando una población de neuroblastos en el GAV, siendo dicha población menor a la marcada por *Fgf19* e *Islet1* (comparar asteriscos en Fig. 32B-N). La expresión de *Ngn1* se restringe únicamente a la porción más rostral del epitelio ótico (Fig. 32O,P), coincidiendo sobre todo con el territorio presuntivo de la mácula del utrículo.

Comparando la expresión de *Fgf19* con la de los genes pro-neurales *NeuroD*, *NeuroM* y *Ngn1*, el *Fgf19* parece marcar una población de neuroblastos, tanto en el epitelio del oído interno como en el GA y mayor a la marcada por dichos genes pro-neurales por separado.

-----►
Figura 32. Patrones de expresión de *Fgf19*, GATA3, *Islet1*, *NeuroD*, *NeuroN* y *Ngn1* en los estadios HH18-20. Secciones horizontales a través del oído interno. (A-D) Las secciones fueron tratadas también con el anticuerpo 3A10. La expresión de *Fgf19* se observa en una banda antero-posterior, siendo más intensa su expresión en la pared anterior. Algunas células *Fgf19* positivas dispersas se observan en la pared posterior, correspondiendo con el dominio sensorial posterior. Los neuroblastos que componen el GAV son *Fgf19* positivos (* en B-D). (E-H). *Islet1* marca una gran población de neuroblastos (cabeza de flecha en E,F; * en E-H). (I-N) La expresión de *NeuroD* y *NeuroM* se observa en la pared anterior del epitelio ótico y en los neuroblastos que se encuentran formando parte del GAV en el mesénquima subyacente (* en I-N). (O,P) La expresión de *Ngn1* se observa solamente en la pared anterior del epitelio ótico. Orientación: A, anterior; M, medial. La barra de aumentos en O indica 31 µm (aplicado a A-P).



3. Diferenciación de los neuroblastos en el estadio HH24

En estadio HH24, el oído interno de aves sufre importantes cambios morfogenéticos. En secciones transversales a través del oído interno de estadio HH24 se observa que la expresión intensa de *Fgf10* forma aún una banda continua antero-posterior (Fig. 33A-D), dejando fuera de esa banda la cresta lateral (cl; Fig. 33B) y la mácula neglecta (ver Capítulo 1; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012).

La expresión de *Fgf19* en la banda antero-posterior de expresión del gen *Fgf10*, que ya se observaba en el estadio de vesícula ótica, aún se observa en secciones transversales de estadio HH24 (Fig. 33E-H). El área de la cresta anterior, innervada por los axones del GAV (3A10 positivos), presenta algunas células *Fgf19* positivas en el borde del territorio innervado (cabeza de flecha en Fig. 33A). Estas células probablemente correspondan con neuroblastos en un estadio previo a su migración. El área más lateral de la mácula del utrículo se encuentra marcada de manera intensa por el gen *Fgf19* (mu; Fig. 33F). Por el contrario, la mácula del sáculo (cabeza de flecha en Fig. 33G) y la papila basilar (no mostrada) muestran algunas células *Fgf19* positivas de manera dispersa. Respecto a la mácula de la lagena, situada en el extremo distal del conducto coclear, este elemento sensorial presenta una fuerte expresión para *Fgf19* (ml; Fig. 33H). Finalmente, el territorio *Fgf10* positivo de la cresta posterior muestra algunas células *Fgf19* positivas (cabeza de flecha en Fig. 33H). Apreciar la expresión intensa de *Fgf19* en los neuroblastos indiferenciados presentes en el GAV. El territorio del GAV marcado por el anticuerpo 3A10, posiblemente correspondiendo a neuronas diferenciadas (asteriscos en Fig. 33E-G), carecen de una expresión fuerte de *Fgf19*.

La expresión de *NeuroD* (Fig. 33I-L) y *NeuroM* (Fig. 33M-P) se observa en la mácula del sáculo y en la mácula del sáculo/papila basilar, siendo siempre la expresión de *NeuroD* más intensa que la de *NeuroM*. Similar a la expresión de *Fgf19*, una porción del GAV no presenta un marcaje tanto de *NeuroD* como *NeuroM* (asteriscos; *NeuroD*: Fig. 33I-K; *NeuroM*: Fig. 33M-O).

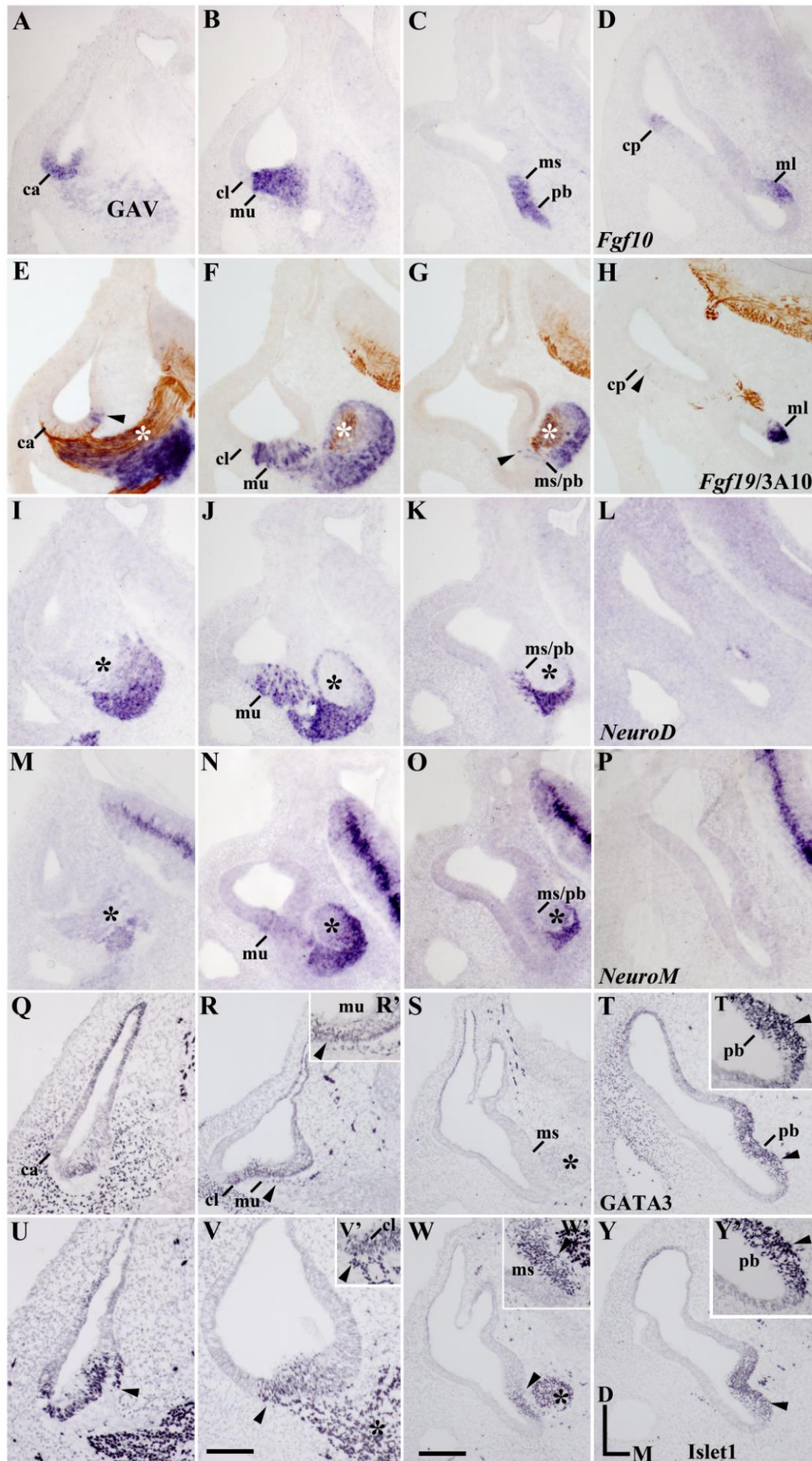
El anticuerpo GATA3 marca el epitelio sensorial de la cresta anterior, lateral, mácula del utrículo y papila basilar, dejando al resto de elementos sensoriales sin marcar (ca, cl, mu, pb, Fig. 33Q-T'), así como los neuroblastos en el GAV (asterisco en Fig. 33S). Solamente hemos observado neuroblastos desprendiéndose del epitelio ótico desde la mácula del utrículo y la papila basilar (cabezas de flecha en Fig. 33R', T'). Por el contrario, el anticuerpo Islet1 fue detectado en el epitelio todos los elementos sensoriales diferenciados en este estadio (Fig. 33U-Y'), excepto la cresta posterior. Además, se observaron neuroblastos delaminándose desde cada uno de los elementos sensoriales marcados por Islet1 (ver cabezas de flecha en U-Y'). También se observó marcaje de Islet1 en los neuroblastos que se encuentran en el GAV (asteriscos en Fig. 33V, W).



Al igual que ocurría en estadio de vesícula ótica (HH18-20), la expresión de *Fgf19*, es más extensa que la de cuatro marcadores pro-neurales con la que se compara (*NeuroD*, *NeuroM*, GATA3 e *Islet1*). Esto sugiere que, al menos en este estadio de desarrollo se pueden desprender neuroblastos de todos los elementos sensoriales especificados, y marcados por el gen *Fgf10*, aunque cada territorio sensorial presente diferencias en el número de neuroblastos que se originan de ellos.

----->

Figura 33. Patrones de expresión de *Fgf10*, *Fgf19*, *NeuroD* y *NeuroM* en el estadio HH24. Secciones transversales a través del epitelio ótico. Las secciones E-H fueron tratadas con el anticuerpo 3A10. **(A-D)** *Fgf10* permite identificar la localización de los elementos sensoriales en el epitelio ótico. **(E-H)** La expresión de *Fgf19* se observa en los mismos territorios marcados por el gen *Fgf10*, pero con diferente intensidad. La cresta anterior presenta células *Fgf19* positivas en su borde (cabeza de flecha en E), mientras que la cresta posterior solamente muestra algunas células dispersas (cabeza de flecha en H). La mácula del utrículo y la mácula de la lagena son las que tienen una mayor expresión de *Fgf19* (mu y ml; F,H). En la mácula del sáculo/papila basilar se observan algunas células dispersas (ms/pb; G). Una parte del GAV es *Fgf19* positivo (* en E-H). **(I-P)** La expresión de *NeuroD* y *NeuroM* fue detectada en la mácula del utrículo, así como en la mácula del sáculo/papila basilar (ms/pb; J,K,N,O). La expresión de *NeuroM* es más suave (mu y ms/pb; N,O). Igualmente, *NeuroD* y *NeuroM* no se expresan en una porción del GAV (* en M-O). **(Q-T')** Marcaje del anticuerpo GATA3, apreciándose neuroblastos desprendiéndose desde la mácula del utrículo y la papila basilar (mu, pb; R,R',T,T'). GATA3 no marca ninguna zona del GAV (* en S). **(U-Y')** El anticuerpo *Islet1* se encuentra marcando el epitelio sensorial de los elementos sensoriales diferenciados, así como a los neuroblastos que se están desprendiendo de ellos (cabezas de flecha en U-Y'). El GAV se encuentra marcado por *Islet1* (* en W,V). Orientación: D, dorsal; M, medial. La barra de aumentos en V indica 28 μ m (aplicado a R',T',U-V',W',Y') y en W indica 35 μ m (aplicado a A-R, S,T,W,Y).





4. Diferenciación de los neuroblastos en el estadio HH27

En estadio HH27, todos los epitelios sensoriales pueden ser fácilmente reconocibles. En secciones transversales a través del oído interno de estadio HH27, la expresión intensa de *Fgf10* está presente en todos los elementos sensoriales (Fig. 34A-C; ver también Fig. 17 del Capítulo 1; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012).

La expresión de *Fgf19* se restringe, a diferencia del estadio anterior, al borde de las crestas (ca; cabezas de flecha en Fig. 34D; ver Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a), mientras mácula neglecta se encuentran desprovistas de marcaje (cl; Fig. 34E; Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a). La mácula del utrículo se encuentra marcada de forma intensa por el gen *Fgf19* (mu; Fig. 34E), mientras que la mácula del sáculo presenta solamente algunas células dispersas *Fgf19* positivas (cabeza de flecha en Fig. 34E). El territorio que separa la papila basilar de la mácula de la lagena muestra una expresión muy fuerte y homogénea de *Fgf19* (flecha en Fig. 34F). Esta porción del epitelioótico no daría lugar a neuroblastos. Sin embargo, la parte distal de la papila basilar y toda la mácula de la lagena presenta células dispersas *Fgf19* positivas, neuroblastos (pb y ml; cabezas de flechas en Fig. 34F y G; ver también Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a).

Con respecto a la expresión de *NeuroD* y *NeuroM*, la expresión de ambos genes fue observada solamente en el territorio de la mácula del utrículo y la mácula del sáculo (ver cabezas de flecha; *NeuroD*, Fig. 34H-J; *NeuroM*, Fig. 34K-M). El resto de elementos sensoriales no muestran células *Fgf19* positivas. Ambos genes muestran una expresión heterogénea en el GAV (ver asteriscos en Fig. 34H-M).

Respecto a los anticuerpos GATA3 e Islet1, GATA3 se encuentra marcando una zona reducida de la cresta anterior, toda la mácula del utrículo, papila basilar y mácula de la lagena, siendo negativo para el resto de epitelios sensoriales (Fig. 34N-K'). Se observan neuroblastos delaminándose GATA3 positivos en la mácula del utrículo y papila basilar (mu, pb; cabezas de flecha en O,O',K,K'). En este estadio se empiezan a observar neuroblastos marcados por GATA3 en el GAV (asterisco en Fig. 34O,K). La expresión de Islet1 continua marcando todos los elementos sensoriales diferenciados incluso la cresta posterior, negativa para Islet1 en el estadio HH24 (Fig. 34R-U'). Se han observado neuroblastos Islet1 positivos desprendiéndose de todos los epitelios sensoriales que se encuentra marcando, excepto de la cresta posterior (ver cabezas de

flecha en Fig. 34R-U'). En este estadio también se observó el marcaje *Islet1* en el GAV (asteriscos en Fig. 34S,U).

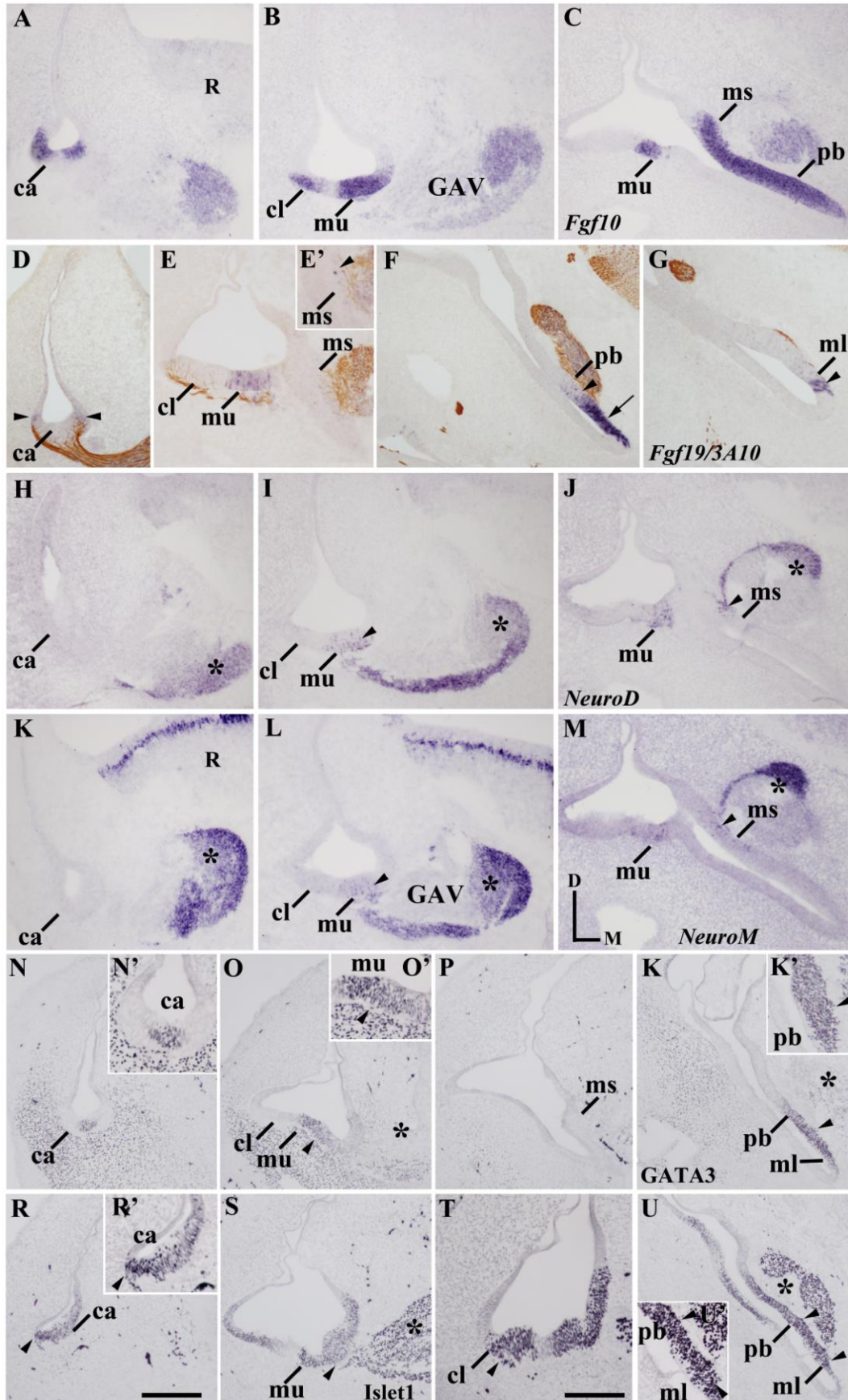




Figura 34. Patrones de expresión de *Fgf10*, *Fgf19*, *NeuroD* y *NeuroM* en el estadio HH27. Secciones transversales. Las secciones D-G fueron tratadas con el anticuerpo 3A10. (A-C) La fuerte expresión de *Fgf10* se encuentra marcando todos los elementos sensoriales. (D-G) La expresión de *Fgf19* se encuentra delimitada a las crestas (ca; D). La mácula del utrículo y mácula de la lagena presentan numerosas células *Fgf19* positivas (mu, E; ml, cabeza de flecha en G), mientras que la mácula del sáculo y la parte distal de la papila basilar muestran un número menor de células *Fgf19* positivas (cabezas de flecha en E,F). (H-M) *NeuroD* y *NeuroM* se expresan en la mácula del utrículo y del sáculo, aunque con diferente grado de intensidad (mu, ms; I,J,L,M). El GAV muestra un marcaje heterogéneo para ambos genes (* en H-M). (N-K') GATA3 se encuentra marcando parte de la cresta anterior, toda la mácula del utrículo, la papila basilar y la mácula de la lagena. Se observaron neuroblastos marcados delaminándose desde la mácula del utrículo y papila basilar (cabezas de flecha en O',K'). Se observan neuroblastos GATA3 positivos en el GAV (* en O,K). (R-U') El anticuerpo Islet1 fue detectado en el epitelio de todos los elementos sensoriales, de donde se desprenden neuroblastos Islet1 positivos, excepto de la cresta posterior (cabezas de flecha en R-U'). Gran número de neuroblastos son marcados en el GAV (* en S,U). Orientación: D, dorsal; M, medial. La barra de aumentos en R indica 47 μ m (aplicado a A-N, O,P,K,R,S,U) y en T indica 39 μ m (aplicado en N',O',K',R',T,U').

5. Correlación entre el origen de los neuroblastos y sus proyecciones al epitelio ótico

Una pregunta clave en el desarrollo del oído interno de vertebrados es determinar qué relación existe entre el origen de las diferentes poblaciones de neuroblastos en el epitelio ótico y sus proyecciones a los diversos elementos sensoriales presentes en el laberinto membranoso. Varias hipótesis se han planteado al respecto (ver Introducción del Capítulo 3).

Para responder a esta pregunta, hemos realizado pequeños trasplantes homotópicos de la placoda en el estadio HH10 (10 somitas). Estos pequeños trasplantes corresponderían a una pequeña porción del ectodermo cefálico, sin tubo neural, intentando tomar cada elemento sensorial por separado. Para ello, nos hemos basado en nuestro estudio previo de mapa de destino (Capítulo 2). Debido a la proximidad entre las diferentes zonas sensoriales y el territorio tan reducido donde se encuentran (placoda ótica), casi siempre hemos tomado más de un elemento sensorial en el mismo trasplante.

6. Trasplante del territorio presuntivo de las crestas

Comenzamos realizando trasplantes de los elementos sensoriales encargados de la percepción de los movimientos rotacionales de la cabeza, las crestas (Fig. 35). Los trasplantes fueron analizados mediante secciones horizontales a través del oído interno quimera en estadio HH32-34 (8-9 días de desarrollo). La detección y localización de las células de codorniz (trasplante) se llevo a cabo gracias al marcaje con el anticuerpo QCPN, mientras que las dendritas de las neuronas sensoriales procedentes del territorio trasplantado fueron detectadas por el anticuerpo QN.

Debido a la dificultad de obtener los elementos sensoriales de manera independiente, en este caso las crestas, solo hemos conseguido tener de la manera aislada la mitad de la cresta posterior (Fig. 35A) y lateral (Fig. 35C). En algunos embriones quimera, las células de codorniz se observaron en aproximadamente la mitad lateral de la cresta posterior (cp; Fig. 35A). En estos casos, las dendritas de las neuronas que se han originado de la zona trasplantada se detectaron solamente innervando a la cresta anterior (ca; cabezas de flecha en Fig. 35B).

De la misma manera, trasplantes de aproximadamente la mitad de la cresta lateral (cl; Fig. 35C), las dendritas de las neuronas originadas desde este territorio únicamente fueron observadas en la cresta anterior (ca; cabeza de flecha en Fig. 35D), en un número mucho más reducido respecto del trasplante de la cresta posterior (comparar ca en Fig. 35B,D).

Trasplantes en los que hemos cogido la mitad lateral de la cresta anterior y parte de la cresta lateral (ca y cl; Fig. 35E,F), las dendritas de las neuronas sensoriales originadas desde estos territorios fueron detectadas innervando, en bajo número, a la cresta anterior (ca; cabeza de flecha en Fig. 35J). Un número muy reducido de dendritas fue detectado en la cresta posterior y lateral (cp y cl; ver cabezas de flecha en Fig. 35K y L, respectivamente). También, se observaron muy pocas dendritas de codorniz en la mácula del sáculo y toda la extensión de la papila basilar (ms y pb; cabezas de flecha en Fig. 35G y H,M, respectivamente).

Trasplantes de la mitad lateral de la cresta posterior y algunas células dispersas en la cresta anterior (ca,cp; Fig. 35N,O) mostraron pocas fibras ópticas innervando a los

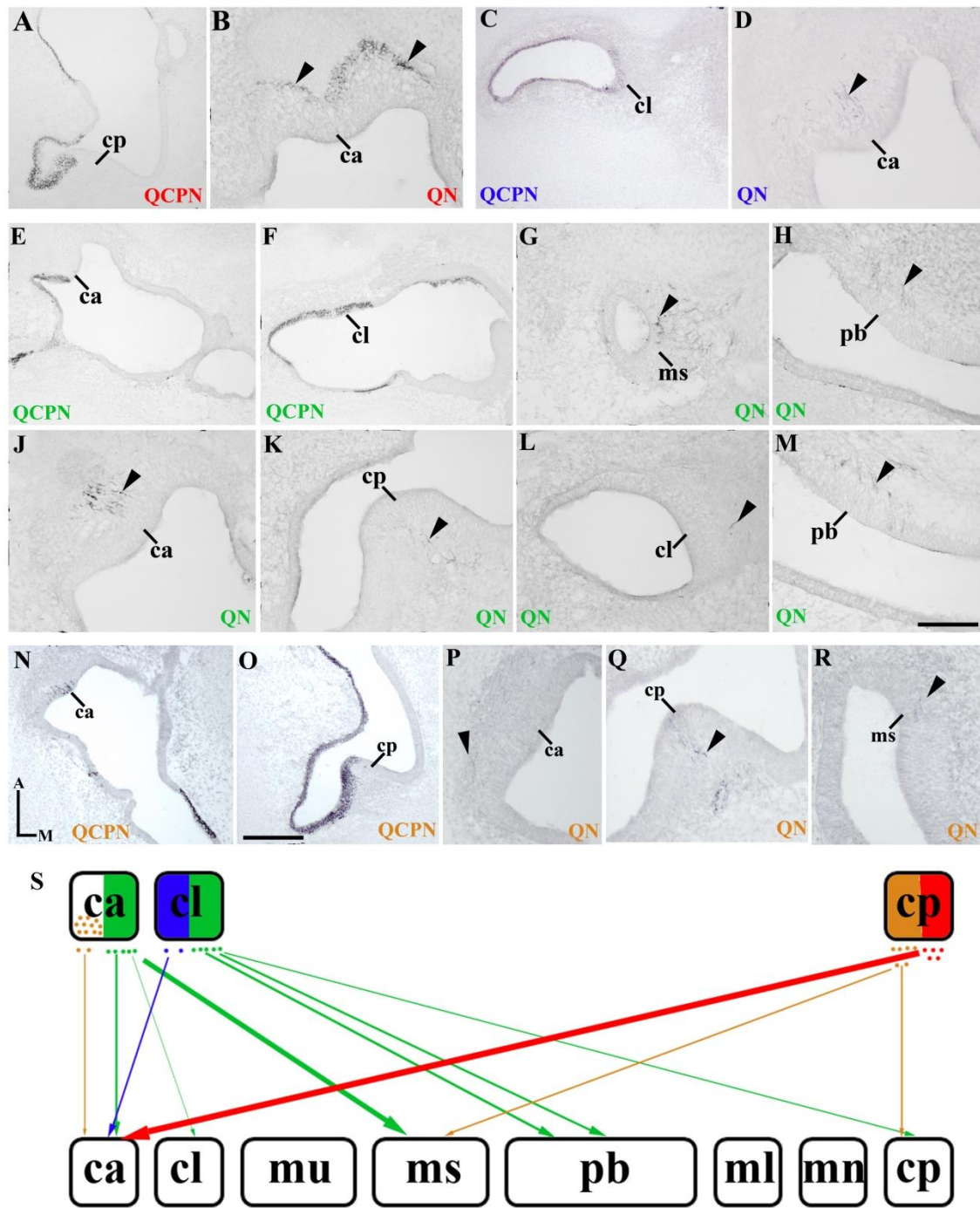


elementos sensoriales. Concretamente, algunas dendritas QN positivas se observaron en la cresta anterior, cresta posterior y mácula del sáculo (ca, cp y ms; cabezas de flecha en Fig. 35P, Q y R, respectivamente). No obstante, más experimentos habría que hacer para confirmar estos resultados.

La Figura 35S es una representación esquemática de los resultados expuestos anteriormente, donde se simboliza con diferentes colores cada uno de los trasplantes. Las imágenes de un mismo trasplante tienen el mismo color tanto en los marcadores usados para el análisis de dicho trasplante como en el esquema de la Fig. 35S. Los neuroblastos que se desprenden del territorio trasplantado se representan con puntos, mientras que la cantidad de dendritas que inervan a cada elemento sensorial se representa con el grosor de las flechas (a mayor número de fibras, mayor grosor de la flecha utilizada). En términos generales, se observa que los neuroblastos con un origen en las crestas no inervan exclusivamente a la cresta de la cual se originaron, pudiendo inervar a otros elementos sensoriales. Incluso se puede dar el caso de que neuroblastos que se originen en una cresta concreta no inervan a esa misma cresta.

----->

Figura 35. Secciones horizontales a través del oído interno de embriones quimeras de HH32 (8 días de desarrollo). **(A,B)** Las células de codorniz se encuentran en la mitad lateral de la cresta posterior (cp; A) y las dendritas inervaron a la cresta anterior (ca; cabezas de flecha en B). **(C,D)** Las células de codorniz se observaron en la cresta lateral (cl; C) y muy pocas dendritas inervando a la cresta anterior (ca; cabeza de flecha en D). **(E-M)** Trasplante de la mitad lateral de la cresta anterior (ca; E) y parte de la cresta lateral (F). En este caso algunas dendritas se observan en la cresta anterior, mácula del sáculo y papila basilar (ca, ms y pb; cabezas de flecha en G-J,M), mientras que dendritas dispersas se aprecian en la cresta posterior y cresta lateral (cp,cl; cabezas de flecha en K,L). **(N-M)** Trasplantes de la mitad lateral de la cresta posterior (cp; O) y con muy pocas células de codorniz en la cresta anterior (ca; N). Algunas dendritas disgregadas se encuentran inervando a la cresta anterior, cresta posterior y mácula del sáculo (ca, cp y ms; cabezas de flecha en P-R). **(S)** Representación esquemática de los trasplantes anteriores. Cada uno de los trasplantes se representa con un color: A-B, rojo; C-D, azul; E-M, verde; N-R; marrón. Los puntos representan los neuroblastos que se desprenden del epitelio ótico y las flechas las dendritas de las neuronas sensoriales inervando a los elementos sensoriales. Orientación: A, anterior; M, medial. La barra de aumentos en O indica 76 μ m (aplicado a A,C,E,F,N,O) y en M indica 53 μ m (aplicado a B,D,G-M,P-R).



7. Trasplante del territorio presuntivo de la mácula del utrículo

Cuando se trasplanta única y exclusivamente la mácula del utrículo (Fig. 36A), las neuronas que se han originado como neuroblastos de esta región sensorial van a generar un alto número de dendritas que inervaran a todos los elementos sensoriales (cabezas de flecha en Fig. 36B-J). Solamente la cresta anterior y cresta lateral presentan, a simple vista, un menor número de dendritas de las neuronas trasplantada (ca, cl; Fig.



36B,E). La Figura 36K representa de manera esquemática los resultados anteriores, donde los neuroblastos se representan con puntos y las dendritas con flechas.

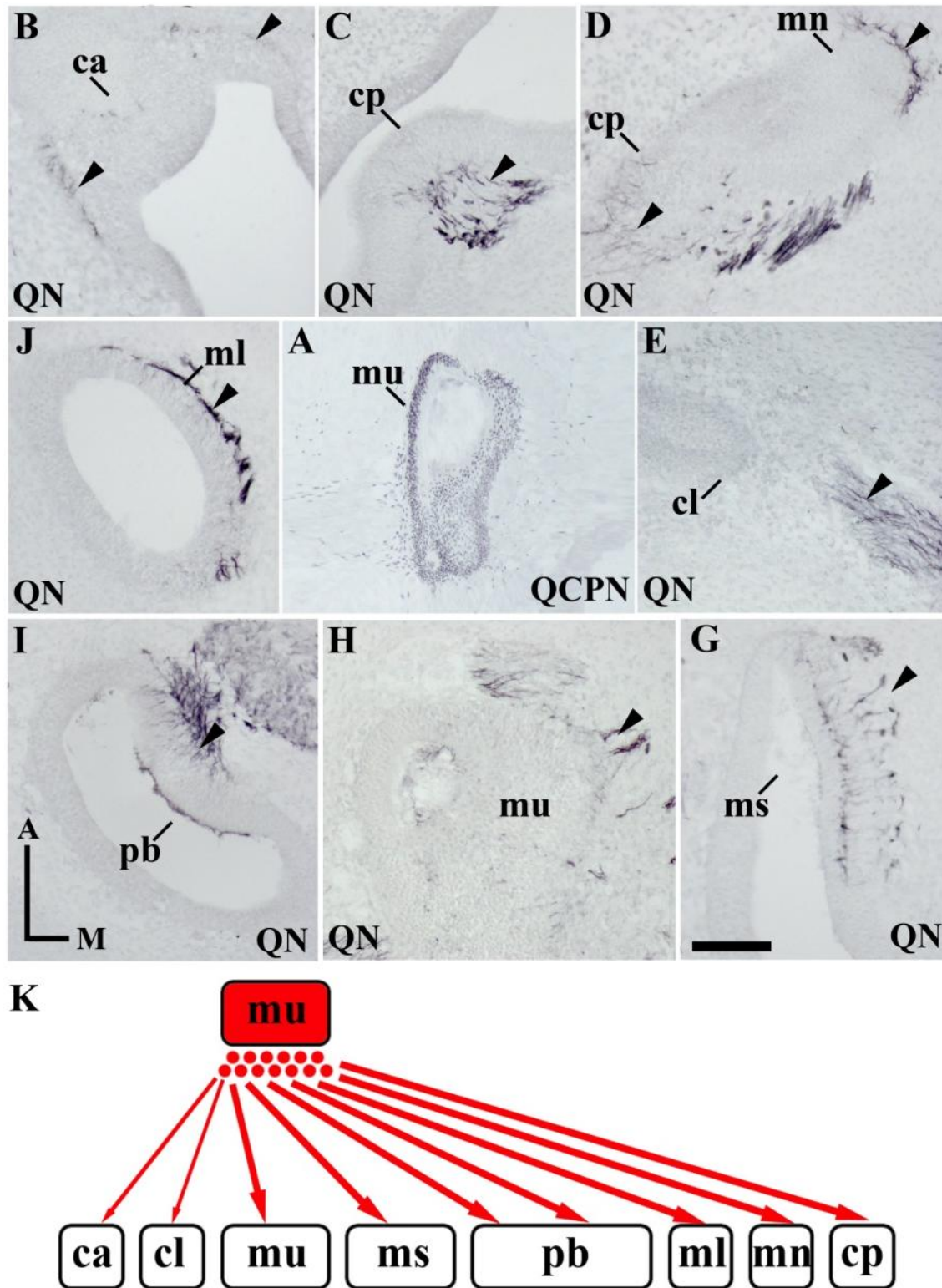


Figura 36. (A-G) Secciones horizontales a través del oído interno de embriones quimeras de HH32 (8 días de desarrollo). Trasplantes que cogen solamente la mácula del utrículo (mu; A). Las dendritas se

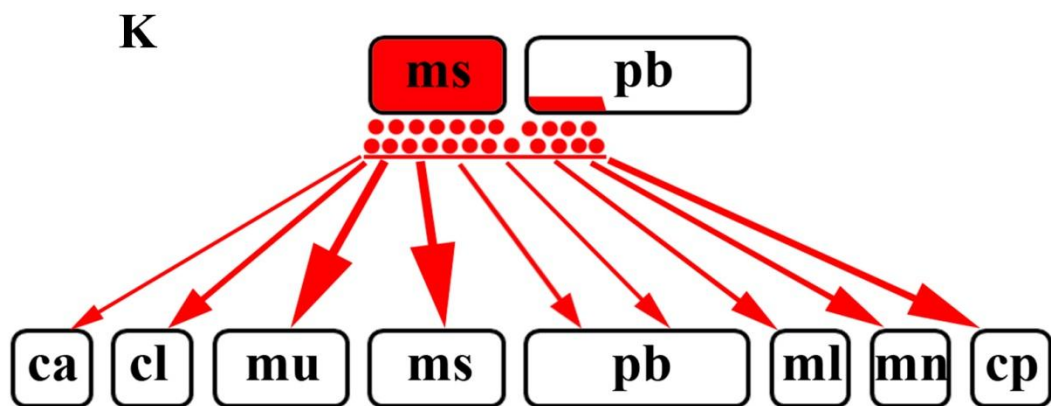
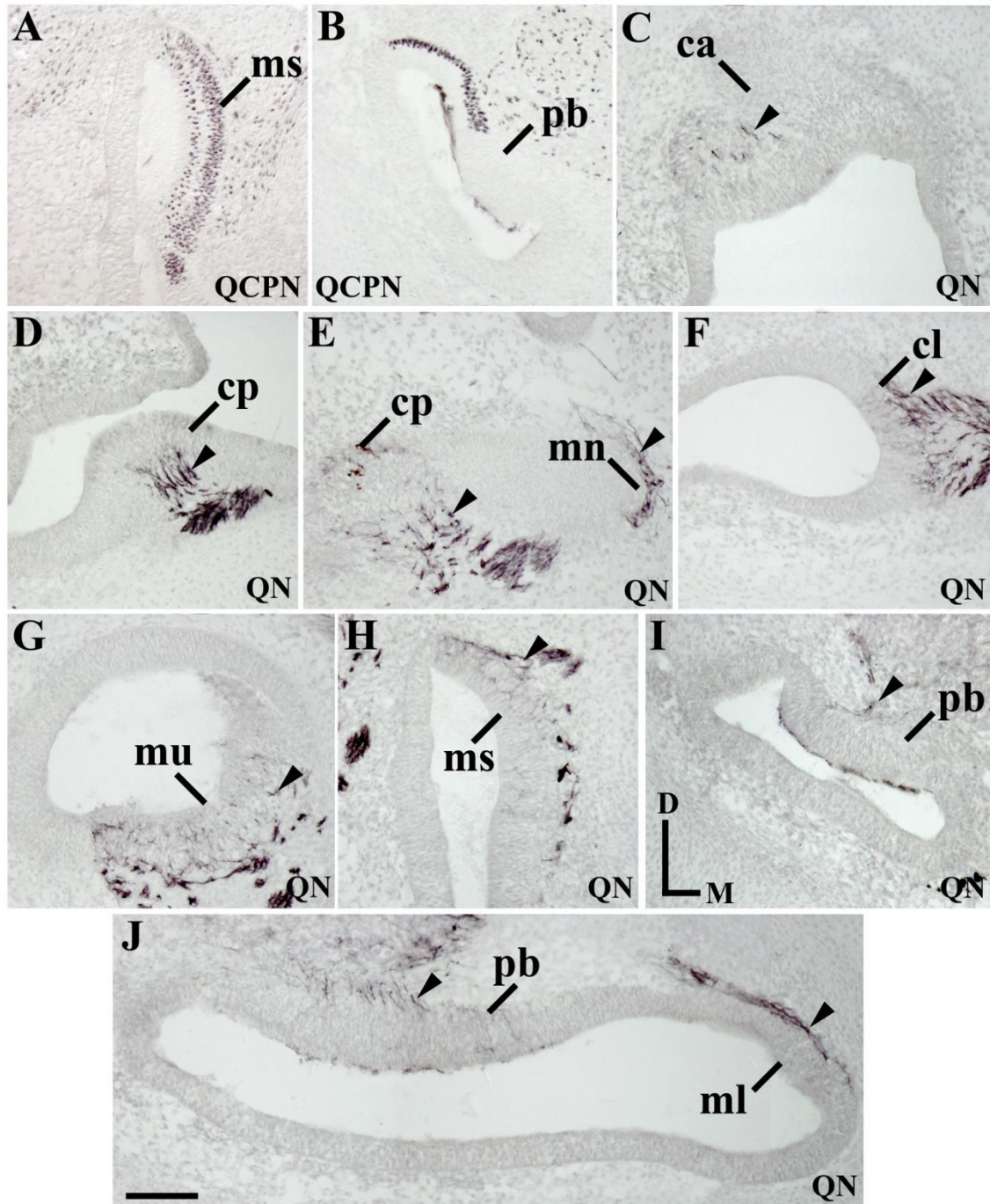
encuentran innervando todos los elementos sensoriales: cresta anterior, posterior y lateral, mácula del utrículo, sáculo, neglecta y lagena, y papila basilar (ca, cp, cl, mu, ms, mn, ml y pb; cabezas de flecha en B-J). (K) Representación esquemática de la porción trasplantada, de donde se van a desprender los neuroblastos que se diferenciarán en neuronas e innervarán a los elementos. Orientación: A, anterior; M, medial. La barra de aumentos en G indica 50 μ m (aplicado a A-G).

8. Trasplante del territorio de la mácula del sáculo y un poco de la papila basilar proximal

En algunos tipos de trasplantes, se ha tomado la mácula del sáculo entera y una porción reducida de la parte proximal de la papila basilar (ms, pb; Fig. 37A,B). Las proyecciones de las neuronas marcadas con el anticuerpo QN fueron observadas en todos los elementos sensoriales (Fig. 37C-J), como se vio también para la mácula del utrículo (Fig. 36). Es interesante resaltar que la mácula del utrículo, la mácula del sáculo, la mácula neglecta, la cresta lateral y la cresta posterior (cabezas de flecha en Fig. 37D-H) parecen recibir un mayor número de dendritas que en el resto de elementos sensoriales: cresta anterior, papila basilar y mácula de la lagena (cabezas de flecha en 37C,I,J). La Figura 37K representa de manera esquemática los resultados anteriores, donde los neuroblastos se representan con puntos y las dendritas con flechas. Las flechas tienen distintos grosores, simulando la cantidad de dendritas observadas en cada elemento sensorial.

-----►

Figura 37. (A-J) Secciones horizontales a través del oído interno de embriones quimeras de HH32 (8 días de desarrollo). El trasplante ocupa la mácula del sáculo y una porción pequeña de la parte proximal de la papila basilar (ms, pb; A,B). Las dendritas se encuentran innervando todos los elementos sensoriales: cresta anterior, posterior y lateral, mácula del utrículo, sáculo, neglecta y lagena, y papila basilar (ca, cp, cl, mu, ms, mn, ml y pb; Cabezas de flecha en C-J). (K) Representación esquemática de los resultados. Orientación: D; dorsal; M, medial. La barra de aumentos en J indica 63 μ m (aplicado a A-J).



9. Trasplante del territorio de la papila basilar distal y la mácula de la lagena

En trasplantes de la porción distal del conducto coclear, las células de codorniz fueron identificadas en toda la mácula de la lagena y la parte más distal de la papila basilar (pb, ml; Fig. 38A,B). Sin embargo, las dendritas de las neuronas procedentes de la fracción trasplantada se observaron en gran número en casi todos los elementos sensoriales. En concreto, se observaron en la cresta lateral y posterior, mácula del utrículo, sáculo y de la lagena, así como en la porción distal de la papila basilar (cl, cp, mu, ms, pb, ml; cabezas de flecha en Fig. 38C-H). Es interesante resalta que el territorio de la papila basilar inervado corresponde a la misma zona distal de la papila basilar, justo en donde se encontraron las células de codorniz. La Figura 38I representa de manera esquemática los resultados del trasplante que coge toda la mácula de la lagena y la porción distal de la papila basilar.

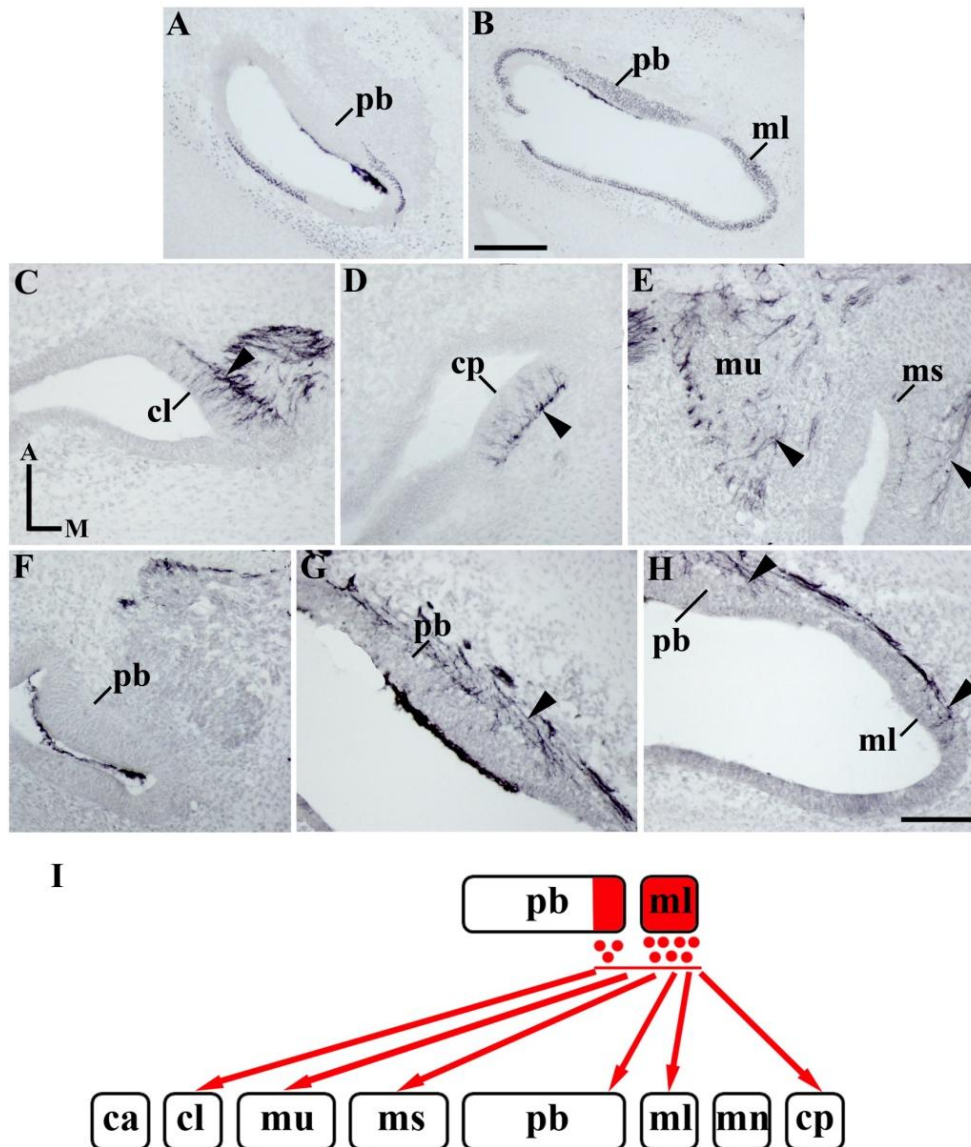




Figura 38. (A-H) Secciones horizontales a través del oído interno de embriones quimeras de HH32 (8 días de desarrollo). Trasplante de la porción distal del conducto cóclea: parte distal de la papila basilar y toda la mácula de la lagena (pb, ml; A,B). Las dendritas se encontraban innervando todos los elementos sensoriales (cl, cp, mu, ms y ml; cabezas de flecha en C-E, H). La parte distal de la papila basilar coincidente con la parte trasplantada (pb; cabezas de flecha F-H). **(I)** Representación esquemática de los neuroblastos (puntos) que se desprenden del territorio trasplantado. Las flechas representan las dendritas de las neuronas sensoriales del GAV que se han desprendido previamente desde el epitelio trasplantado. Orientación: A, anterior; M, medial. La barra de aumentos en B indica 75 μm (aplicado a A,B) y en H indica 67 μm (aplicado a C-H).

10. Trasplante del territorio de la papila basilar, mácula de la lagena y cresta posterior

Algunos embriones quimera presentaban un trasplante parecido al mostrado en el apartado anterior, pero además incluyen la mitad lateral de la cresta posterior en el epitelio trasplantado (cp, pb, ml; Fig. 39A-C). Las dendritas de las neuronas sensoriales, QN positivas, originadas desde la porción trasplantada, fueron observadas en la cresta posterior y mácula neglecta (cp, mn; Fig. 39D,E), la parte del territorio trasplantado de la papila basilar y toda la mácula de la lagena (pb, ml; Fig. 39I). Aparentemente, el número total de dendritas podría ser similar al del tipo anterior (Fig. 38). Sin embargo, aunque las dendritas QN positivas fueron también observadas en la cresta lateral, mácula del utrículo y mácula del sáculo como en el caso anterior, estas zonas sensoriales presentaban un menor número de dendritas innervándolas, que lo observado en el caso anterior (cl, mu y ms; comparar Fig. 39F-H y Figs. 38C,E). La Figura 39J representa de manera esquemática los resultados de este tipo de trasplante.

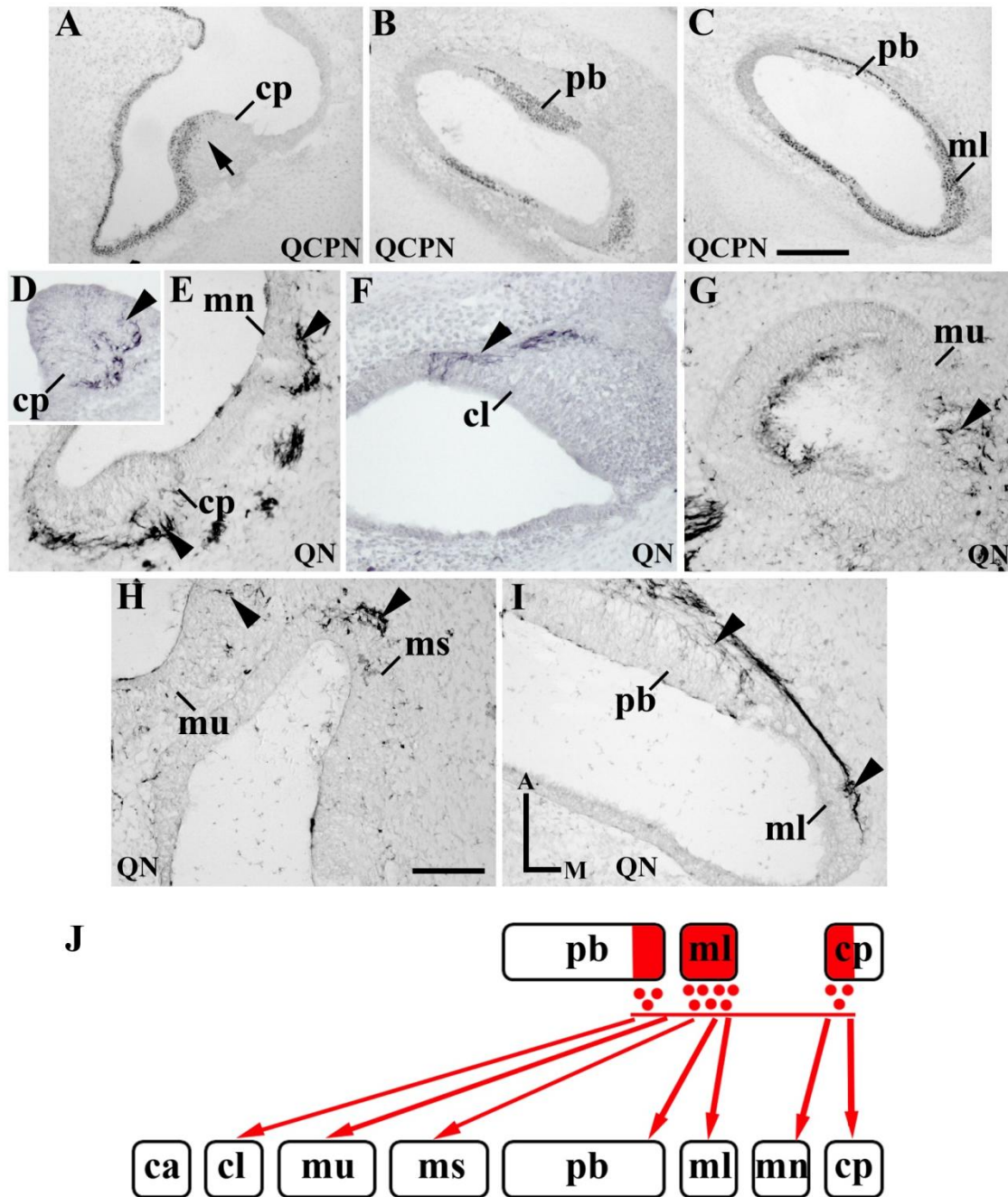


Figura 39. (A-I) Secciones horizontales a través del oído interno de embriones quimeras de HH32 (8 días de desarrollo). Las células de codorniz se observan en la mitad lateral de la cresta posterior (cp; flecha en A), en la porción más distal de la papila basilar y toda la mácula de la lagena (pb, ml; B,C). Las dendritas se encuentran innervando a la cresta posterior y lateral, mácula neglecta, utrículo, sáculo, lagena, y papila basilar (cp, cl, mn, mu, ms, ml y pb; Cabezas de flecha en D-I). (J) Representación esquemática de los resultados. Los neuroblastos se representan como puntos y las dendritas como flechas. Orientación: A, anterior; M, medial. La barra de aumentos en C indica 66 μ m (aplicado a A-C) y en H indica 53 μ m.

DISCUSIÓN

El oído interno es un complejo órgano sensorial que, en los vertebrados superiores, puede contener de seis a ocho elementos sensoriales, los cuales se clasifican en tres tipos diferentes: (1) las crestas, para detectar las aceleraciones rotacionales; (2) las máculas, las cuales detectan las aceleraciones lineares y gravedad; y (3) una estructura sensorial capaz de detectar el sonido (papila basilar en aves; órgano de Corti en mamíferos). Cada órgano sensorial contiene células ciliadas y células de soporte.

Hay que tener en cuenta que la placoda ótica no solo dará lugar a todos los componentes epiteliales (sensoriales y no sensoriales), sino que también es el origen de las neuronas del ganglio acústico-vestibular (GAV; VIII par craneal). Los neuroblastos se originan de la pared ventro-medial de la vesícula ótica en un proceso de la migración desde esta región del epitelio ótico hacia el mesénquima subyacente. Ya en el mesénquima, estos neuroblastos se diferenciarán en neuronas, formando el GAV, las cuales inervarán a las células ciliadas del oído interno (proyecciones aferentes).

1. Inervación de los elementos sensoriales: una posible relación directa entre origen y destino

Para explicar el establecimiento de las proyecciones aferentes de los neuroblastos hacia las células ciliadas del oído interno en desarrollo, se planteó una primera hipótesis. Este primer planteamiento sugiere un “mecanismo de guía axonal reverso”, por el cual las proyecciones neuronales regresan al mismo territorio sensorial de donde se originaron los correspondiente neuroblastos. Se utilizaría como guía el contacto con los neuroblastos que continúan desprendiéndose de una porción pequeña y definida del epitelio ótico, e incluso la interacción con las fibras pioneras de las primeras neuronas diferenciadas del GAV a esos mismos elementos sensoriales. Esta hipótesis está basada en varias evidencias morfológicas. Los neuroblastos emitirían sus prolongaciones hacia el epitelio ótico inmediatamente después de iniciar la transición epitelio-mesénquima y tras una corta migración (Carney y Silver, 1983; Bruce *et al.*, 1997). Esta hipótesis ha sido recientemente confirmada: las células que se desprenden del epitelio ótico migrarían aparentemente siguiendo las fibras de neuronas más diferenciadas que proyectan hacia los futuros elementos sensoriales (Fariñas *et al.*, 2001; Fritzsche *et al.*, 2002). Además, se ha propuesto que las neuronas vestibulares y auditivas del GAV tendrían un origen distinto en la placoda ótica. Según esta segregación, la porción antero-lateral de la placoda ótica generaría neuronas



vestibulares, mientras que la porción postero-medial daría lugar a neuronas auditivas. El origen de los elementos sensoriales vestibulares y auditivos tendrían una distribución similar en la placoda ótica (Bell *et al.*, 2008). De una u otra manera, esta hipótesis plantea un requisito imprescindible: todos los elementos sensoriales deberían generar sus propios neuroblastos (ver Fritzsche, 2003; Fekete y Campero, 2007).

Recientemente se ha descrito que la región antero-medial de la placoda ótica es donde se localizan los precursores neuronales (Alsina *et al.*, 2004; Abelló *et al.*, 2007). Estas observaciones contradicen la hipótesis planteada dado que, como sabemos por nuestro mapa de destino (Capítulo 2), la porción posterior de la placoda ótica dará lugar a varios elementos sensoriales (entre ellos: la mácula de la lagena, mácula neglecta y cresta posterior) y estas porciones no darían neuroblastos. No obstante, estas observaciones habría que confirmarlas en el estadio de copa ótica, una vez que la diferenciación de los primeros neuroblastos ha tenido lugar (Álvarez *et al.*, 1989; Hemond y Morest, 1991; Adam *et al.*, 1998). En estos estadios, los precursores neuronales, marcados por la expresión de *Islet1* y *Fgf19*, se originarían justo en la interacción entre dos dominios: uno *Fgf10* positivo y el otro *Otx2* positivo (Alsina *et al.*, 2004; Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a; ver Fig. 8, Introducción General). Por lo tanto, los neuroblastos se podrían originar a lo largo de la banda antero-posterior de expresión del gen *Fgf10* (pan-sensorial). Estas observaciones habría que confirmarlas en el estadio de vesícula ótica (ver Capítulo 2; Sánchez-Guardado *et al.*, 2012).

Numerosos genes están implicados directamente en la diferenciación de los neuroblastos y la consecuente formación del GAV. Por ejemplo, la alteración de la expresión de *Neurogenin 1* (*Ngn1*) conduce a una ausencia de neuronas, además de una carencia de células ciliadas (Ma *et al.*, 2000). *NeuroD* y *NeuroM*, regulados por *Ngn1*, están implicados en la migración y guía axonal, así como en la supervivencia de las neuronas sensoriales (Liu *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001). *Gata3* ha sido propuesto como un marcado de neuroblastos cocleares (Karis *et al.*, 2001; Lawoko-Kerali *et al.*, 2004; Livellali *et al.*, 2004, 2006, 2007; Jones y Warchol, 2009). No obstante, no queda claro si *Gata3* marca los neuroblastos en el proceso de transición entre el epitelio ótico y el mesénquima (Lawoko-Kerali *et al.*, 2004; Jones y Warchol, 2009), por lo que sería necesario revisar estas observaciones. *Islet1* regularía la diferenciación de los neuroblastos, siendo propuesto como un buen marcado de todos los neuroblastos (Adam *et al.*, 1998; Camarero *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Radde-

Gallwitz *et al.*, 2004). Además, el origen topológico de las primeras neuronas en el epitelio del otocisto ha sido caracterizado en parte por la expresión de *Fgf19* (Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a). Sin embargo, estos resultados se han realizado en diferentes grupos de vertebrados y en estadios de desarrollo distintos, por lo que se hace necesaria una caracterización exhaustiva y en detalle, utilizando, por ejemplo, el desarrollo de aves como modelo experimental.

En este trabajo, hemos realizado un estudio detallado de la diferenciación de los neuroblastos desde el estadio de copa, momento de la diferenciación de los primeros neuroblastos, hasta el estadio HH27, cuando comienza a cesar la diferenciación y migración de los últimos. Nuestros resultados muestran que todos los elementos sensoriales generan neuroblastos. No obstante, existen diferencias cuantitativas entre las diferentes porciones sensoriales del epitelio ótico.

Todas las crestas, incluida la cresta lateral, generan neuroblastos. La expresión de *Fgf19* muestra células dispersas en la pared anterior de la copa ótica de estadio HH14, las cuales también aparecen en la pared posterior en el estadio HH17. Estas células, observadas sobre todo en la porción basal del epitelio ótico, serían neuroblatos de los elementos sensoriales más anteriores y posteriores, la cresta anterior y la cresta posterior. Estas observaciones se verifican en el estadio de vesícula ótica y se confirman en el estadio HH24. En el estadio HH27, una porción muy reducida del territorio invadido de las tres crestas, situada en los bordes de estos elementos sensoriales y marcados por la expresión del gen *Fgf19* (este trabajo y Sánchez-Calderón *et al.*, 2007a), presenta células *Islet1* positivas. Estos neuroblastos no estarían marcados por la expresión de *Ngn1*, *NeuroD* o *NeuroM*, sugiriendo que una combinación específica de genes definirían subpoblaciones del neuroblastos en el GAV.. Todas estas observaciones claramente muestran que todas las crestas generan neuroblastos.

La expresión de todos los marcadores utilizados (*Fgf19*, *NeuroD*, *NeuroM*, *Ngn1*, *Islet1* y *GATA3*) muestran que la mácula del utrículo genera una gran cantidad de neuroblastos, siendo el elemento sensorial que más neuroblastos aporta al GAV en desarrollo (Fritsch *et al.*, 2002; Satoh y Fekete, 2005; Raft *et al.*, 2007). Es interesante destacar el gradiente de generación de neuroblastos desde el borde lateral de la mácula del utrículo, justo desde el límite con la cresta lateral, hacia su porción más medial. Estas observaciones confirman la idea de que una gran población de neuroblastos se



originan de la porción anterior y ventral del esbozo ótico en el estadio vesícula (Noden y van de Water, 1986; Álvarez y Navascués, 1990; Hemond y Morest, 1991; Adam *et al.*, 1998, Hidalgo-Sánchez *et al.*, 2000). La mácula del sáculo, por su proximidad con la mácula del utrículo, también genera neuroblastos, pero en menor cantidad, quizá asociado al gradiente de generación latero-medial observado en la mácula del utrículo. Hay que destacar que la papila basilar también genera neuroblastos, pero mucho más tarde (HH24) (ver la expresión de *Fgf19*). La expresión de *Fgf19* muestra que la mácula de la lagena presenta células con aspecto de neuroblastos, es decir, células dispersas localizadas principalmente en las cercanías de la lámina basal. La expresión de GATA3 e *Islet1* han puesto de manifiesto la existencia de células desprendiéndose del epitelio ótico al nivel de la mácula neglecta. Por lo tanto, la mácula de la lagena y la mácula neglecta también generan neuroblastos. Como conclusión, afirmar que tanto las crestas (anterior, lateral y posterior) como las máculas (del utrículo, del sáculo, de la lagena y la neglecta), así como la papila basilar, todos ellos generan neuroblastos, en especial la mácula del utrículo. De esta manera, se cumple la premisa necesaria del modelo de un “mecanismo de guía axonal reverso”: cada elemento sensorial generaría neuroblasto. Quedaría por confirmar las proyecciones de esas subpoblaciones de neuroblastos.

2. Modelo de la distribución de las proyecciones aferentes

En oposición al modelo “mecanismo de guía axonal reverso” discutido anteriormente, se ha propuesto que el territorio sensorial del epitelio ótico que van a ser innervado por las dendritas no mantiene una correlación topográfica entre su origen y destino (Noden y van de Water, 1986; ver Fekete y Campero, 2007). Nuestros resultados confirman esta última hipótesis, estando en desacuerdo con la idea de que la región de donde se desprenden ciertos neuroblastos va a ser posteriormente innervada por las dendritas de esas mismas neuronas. Varias evidencias lo corroboran: (1) la cresta anterior (su parte más lateral) genera neuroblastos que proyectan sobre todo a la mácula del sáculo; (2) los neuroblastos de la cresta lateral proyectan fibras a la cresta anterior; y (3) los neuroblastos procedente de la cresta posterior (su parte más lateral) proyectan sobre todo a la cresta anterior (Fig. 36). Además, los neuroblastos de la mácula del utrículo proyectan a todos los elementos sensoriales, si bien con diferentes grados de participación (Fig. 37). Los neuroblastos de la mácula del utrículo y la mácula de la lagena presentaría un patrón de innervación similar al mostrado por los de la mácula del

utrículo, aunque no se puede afirmar definitivamente por la pequeña participación en estos trasplantes de la papila basilar (Figs. 38 y 39; ver también Fig. 40).

De esta manera, no se confirma la hipótesis del “mecanismo de guía axonal reverso”. Existiría un solapamiento parcial entre el lugar de donde se originan los neuroblastos y el primordio sensorial que posteriormente inervarán (Satoh y Fekete, 2005). Por lo tanto, los resultados obtenidos están más en concordancia con la idea de que la inervación de los distintos elementos sensoriales viene dada por quimio-atrayentes/quimio-repelentes de largo alcance (ver Fekete y Campero, 2007).

3. Mecanismos de guía axonal: perspectivas de futuro

En los últimos años, han sido descritas varias familias de genes que están implicados en la atracción y repulsión de las dendritas en el desarrollo de los sistemas sensoriales, incluyendo: *netrinas* (Kennedy *et al.*, 1994; Serafini *et al.*, 1994), *semaforinas* (Kolodkin *et al.*, 1992; Luo *et al.*, 1993), *epinefrinas* (Drescher *et al.*, 1995) y la familia *Slit/robo* (Seeger *et al.*, 1993; Kidd *et al.*, 1998). También, se han identificado factores como las *neurotrofinas*, principalmente BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) y NT-3 (*neurotrofina-3*) en el desarrollo del oído interno (Pirvola *et al.*, 1992). Además, se han caracterizado los efectos de sus mutaciones (Frittsch *et al.*, 1999). Se ha visto que su expresión en los órganos sensoriales es algo más tardía que la llegada de las primeras dendritas a dichas zonas sensoriales. Por lo tanto, estos factores serían esenciales para el mantenimiento y supervivencia de las primeras inervaciones (Frittsch, 2003). Estos resultados han sido revisados recientemente (Fekete *et al.*, 2007).

Debido a que las *neurotrofinas* son importantes en la inervación de los distintos elementos sensoriales, y aunque su expresión comience después de que se produzcan esas primeras inervaciones, se ha continuado investigando en busca de posibles factores o moléculas que estén implicadas en la atracción de esas dendritas que realizan las primeras inervaciones en los elementos sensoriales. Morfógenos, tales como BMPs, SHH, WNTs y FGFs, los cuales se expresan en el oído interno y los tejidos circundantes durante los estadios de crecimiento y guía axonal, han cobrado especial interés (Webber y Raz, 2006; Fekete y Campero, 2007).



Los resultados para BMPs, SHH y FGFs, sugieren la posibilidad de que podrían actuar como factores tróficos una vez que las neuronas comienzan a diferenciarse, no solamente en pollo, sino quizás también en otras especies (Fantetti y Fekete, 2012). Más trabajos sobre crecimiento y supervivencia neuronal del GAV serían necesarios para confirmar el posible papel de los WNTs en los procesos de guía axonal en el desarrollo del oído interno (Fantetti *et al.*, 2011). De esta manera, estos morfógenos podrían actuar como señales atrayentes de corto alcance para establecer las primeras inervaciones, para luego dar paso a las señales de largo alcance, como podrían ser las neurotrofinas (Fekete y Campero, 2007).

Nuestros trabajos podrían ser considerados como un buen punto de partida en el planteamiento de nuevas estrategias experimentales, dado que resuelve dos dudas claves sobre: (1) el origen de las diferentes subpoblaciones de los neuroblastos en relación con los diferentes elementos sensoriales y (2) establece un patrón de inervación entre el origen de los neuroblastos y el destino de sus proyecciones. Sería necesario conocer, en el caso particular en aves, el patrón de expresión de las diferentes familias de moléculas implicadas en la guía axonal, tanto atrayentes como repelentes. Esos trabajos serían útiles para diseñar estudios *in vitro* que confirmaran la función de estas moléculas en la orientación de axón de subpoblaciones de neuroblastos hacia su destino específico. Un estudio más completo de los morfógenos conocidos permitiría determinar en qué medida estas moléculas difusibles controlarían el refinamiento de estos procesos de inervación del epitelio ótico en desarrollo.

4. Investigaciones en el desarrollo del GAV y la inervación de las células ciliadas: posibles avances en terapia celular

La pérdida auditiva retro-coclear o detrimento de la percepción del equilibrio viene dada por el deterioro o degeneración del nervio auditivo y vestibular, respectivamente. Por otra parte, la alteración de la función del oído interno puede ser una consecuencia de la pérdida de las células ciliadas, o podría venir derivada de ciertas neuropatías. Dicha pérdida de las neuronas, limita el éxito de los implantes cocleares y vestibulares, actualmente el único remedio para minimizar el tremendo efecto personal y social de los individuos con este problema.

El conocimiento del desarrollo y las bases moleculares implicados en el crecimiento dirigido de los axones/dendritas de las neuronas ganglionares es uno de los procesos más complicados en la regeneración neuro-sensorial del oído interno. Por ello, estudiar el desarrollo de los axones/dendritas de las neuronas sensoriales del GAV podría proporcionarnos una idea de cómo se produce el crecimiento y guía de las fibras nerviosas sensoriales. Dicha información, a su vez, nos podría permitir conocer mejor los procesos de neurogénesis durante el desarrollo del oído interno.

Por lo tanto, las investigaciones de guía axonal en el oído interno obviamente puede tener algunas implicaciones clínicas. Las investigaciones se centran en la preservación o recuperación de las neuronas del GAV que degeneran en individuos sordos, como una consecuencia secundaria de la pérdida de los factores que mantienen la supervivencia de las células ciliada. Además, perspectivas terapéuticas para la regeneración de las células ciliadas prevén que las dendritas de las nuevas neuronas sensoriales del GAV alcancen a las nuevas células ciliadas para establecer conexiones funcionales. Así, adquiriría una gran importancia el identificar las moléculas atrayentes y repelentes para estos tipos de neuronas que actúan durante el desarrollo embrionario, y para determinar si algunas de estas moléculas están implicadas en la innervación de las células ciliadas posiblemente regeneradas. En cualquier caso, la medida terapéutica requiere que las neuronas del GAV realicen una correcta conexión con el epitelio sensorial y su correspondiente núcleo en el rombencéfalo (Fekete y Campero, 2007). En el futuro, más estudios funcionales serán necesarios al respecto.

CONCLUSIONES

Del estudio en detalle de la migración de los neuroblastos desde el epitelio ótico hacia al mesénquima subyacente, en donde se diferencian en neuronas sensoriales del ganglio acústico-vestibular, así como el análisis de las proyecciones de un número reducido de neuroblasto mediante el modelo experimental de embriones quimera pollo/codorniz, han surgido las siguientes conclusiones:

PRIMERA – Los neuroblastos, que formarán el ganglio acústico-vestibular, se desprenden del territorio presuntivo de todos los elementos sensoriales del oído interno en desarrollo.

SEGUNDA – La inervación de los elementos sensoriales del oído interno por las neuronas sensoriales del ganglio acústico-vestibular no mantiene una correlación topográfica espacial entre su origen y su destino.

BIBLIOGRAFÍA

- Abello G, Alsina B.** 2007. Establishment of a proneural field in the inner ear. *Int J Dev Biol* 51(6-7):483-493.
- Abello G, Khatri S, Giraldez F, Alsina B.** 2007. Early regionalization of the otic placode and its regulation by the Notch signaling pathway. *Mech Dev* 124(7-8):631-645.
- Acampora D, Gulisano M, Simeone A.** 1999. Otx genes and the genetic control of brain morphogenesis. *Mol Cell Neurosci* 13(1):1-8.
- Acampora D, Gulisano M, Simeone A.** 2000. Genetic and molecular roles of Otx homeodomain proteins in head development. *Gene* 246(1-2):23-35.
- Acampora D, Mazan S, Avantaggiato V, Barone P, Tuorto F, Lallemand Y, Brulet P, Simeone A.** 1996. Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the Otx1 gene. *Nat Genet* 14(2):218-222.
- Adam J, Myat A, Le Roux I, Eddison M, Henrique D, Ish-Horowicz D, Lewis J.** 1998. Cell fate choices and the expression of Notch, Delta and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with *Drosophila* sense-organ development. *Development* 125(23):4645-4654.
- Adamska M, Herbrand H, Adamski M, Kruger M, Braun T, Bober E.** 2001. FGFs control the patterning of the inner ear but are not able to induce the full ear program. *Mech Dev* 109(2):303-313.
- Alsina B, Abello G, Ulloa E, Henrique D, Pujades C, Giraldez F.** 2004. FGF signaling is required for determination of otic neuroblasts in the chick embryo. *Dev Biol* 267(1):119-134.
- Alsina B, Giraldez F, Pujades C.** 2009. Patterning and cell fate in ear development. *Int J Dev Biol* 53(8-10):1503-1513.
- Alsina B, Giraldez F, Varela-Nieto I.** 2003. Growth factors and early development of otic neurons: interactions between intrinsic and extrinsic signals. *Curr Top Dev Biol* 57:177-206.
- Altman J, Bayer, A.B.** 1983. Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat. Springer Verlag New York.
- Altman J, Bayer SA.** 1982. Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 74:1-90.
- Alvarado-Mallart RM, Sotelo C.** 1984. Homotopic and heterotopic transplantations of quail tectal primordia in chick embryos: organization of the retinotectal projections in the chimeric embryos. *Dev Biol* 103(2):378-398.
- Alvarez IS.** 1988. Estudio estructural y morfométrico de las primeras fases del desarrollo del embrión de pollo. Tesis Doctoral Universidad de Extremadura.
- Alvarez IS, Martin-Partido G, Rodriguez-Gallardo L, Gonzalez-Ramos C, Navascues J.** 1989. Cell proliferation during early development of the chick embryo otic anlage: quantitative comparison of migratory and nonmigratory regions of the otic epithelium. *J Comp Neurol* 290(2):278-288.
- Alvarez IS, Navascues J.** 1990. Shaping, invagination, and closure of the chick embryo otic vesicle: scanning electron microscopic and quantitative study. *Anat Rec* 228(3):315-326.
- Alvarez Y, Alonso MT, Vendrell V, Zelarayan LC, Chamero P, Theil T, Bosl MR, Kato S, Maconochie M, Riethmacher D, Schimmang T.** 2003. Requirements for FGF3 and FGF10 during inner ear formation. *Development* 130(25):6329-6338.
- Ang SL, Conlon RA, Jin O, Rossant J.** 1994. Positive and negative signals from



mesoderm regulate the expression of mouse *Otx2* in ectoderm explants. *Development* 120(10):2979-2989.

Anniko M. 1979. Extracorporeal preservation. Organ culture of the post-natal mammalian inner ear. *Acta Otolaryngol* 88(3-4):211-219.

Avallone B, Balsamo G, Trapani S, Marmo F. 2002. Apoptosis during chick inner ear development: some observations by TEM and TUNEL techniques. *Eur J Histochem* 46(1):53-59.

Avantaggiato V, Acampora D, Tuorto F, Simeone A. 1996. Retinoic acid induces stage-specific repatterning of the rostral central nervous system. *Dev Biol* 175(2):347-357.

Baker CV, Bronner-Fraser M. 2001. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol* 232(1):1-61.

Bang PI, Sewell WF, Malicki JJ. 2001. Morphology and cell type heterogeneities of the inner ear epithelia in adult and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 438(2):173-190.

Bardet SM, Cobos I, Puelles E, Martinez-De-La-Torre M, Puelles L. 2006. Chicken lateral septal organ and other circumventricular organs form in a striatal subdomain abutting the molecular striatopallidal border. *J Comp Neurol* 499(5):745-767.

Bates CM. 2011. Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development. *Am J Physiol Renal Physiol* 301(2):F245-251.

Battisti AC, Fekete DM. 2008. Slits and Robos in the developing chicken inner ear. *Dev Dyn* 237(2):476-484.

Beisel KW, Wang-Lundberg Y, Maklad A, Frittsch B. 2005. Development and evolution of the vestibular sensory apparatus of the mammalian ear. *J Vestib Res* 15(5-6):225-241.

Bell D, Streit A, Gorospe I, Varela-Nieto I, Alsina B, Giraldez F. 2008. Spatial and temporal segregation of auditory and vestibular neurons in the otic placode. *Dev Biol* 322(1):109-120.

Bermingham NA, Hassan BA, Price SD, Vollrath MA, Ben-Arie N, Eatock RA, Bellen HJ, Lysakowski A, Zoghbi HY. 1999. *Math1*: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284(5421):1837-1841.

Bermingham-McDonogh O, Stone JS, Reh TA, Rubel EW. 2001. FGFR3 expression during development and regeneration of the chick inner ear sensory epithelia. *Dev Biol* 238(2):247-259.

Bertolino E, Reimund B, Wildt-Perinic D, Clerc RG. 1995. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J Biol Chem* 270(52):31178-31188.

Bever MM, Fekete DM. 2002. Atlas of the developing inner ear in zebrafish. *Dev Dyn* 223(4):536-543.

Bianchi LM, Gray NA. 2002. EphB receptors influence growth of ephrin-B1-positive statoacoustic nerve fibers. *Eur J Neurosci* 16(8):1499-1506.

Bissonnette JP, Fekete DM. 1996. Standard atlas of the gross anatomy of the developing inner ear of the chicken. *J Comp Neurol* 368(4):620-630.

Blentic A, Gale E, Maden M. 2003. Retinoic acid signalling centres in the avian embryo identified by sites of expression of

- synthesising and catabolising enzymes. *Dev Dyn* 227(1):114-127.
- Bok J, Chang W, Wu DK.** 2007. Patterning and morphogenesis of the vertebrate inner ear. *Int J Dev Biol* 51(6-7):521-533.
- Bok J, Raft S, Kong KA, Koo SK, Drager UC, Wu DK.** 2011. Transient retinoic acid signaling confers anterior-posterior polarity to the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(1):161-166.
- Bosse A, Zulch A, Becker MB, Torres M, Gomez-Skarmeta JL, Modolell J, Gruss P.** 1997. Identification of the vertebrate Iroquois homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. *Mech Dev* 69(1-2):169-181.
- Brigande JV, Iten LE, Fekete DM.** 2000. A fate map of chick otic cup closure reveals lineage boundaries in the dorsal otocyst. *Dev Biol* 227(2):256-270.
- Brigande JV, Kiernan AE, Gao X, Iten LE, Fekete DM.** 2000. Molecular genetics of pattern formation in the inner ear: do compartment boundaries play a role? *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22):11700-11706.
- Bronner-Fraser M, Fraser S.** 1989. Developmental potential of avian trunk neural crest cells in situ. *Neuron* 3(6):755-766.
- Brooker R, Hozumi K, Lewis J.** 2006. Notch ligands with contrasting functions: Jagged1 and Delta1 in the mouse inner ear. *Development* 133(7):1277-1286.
- Brors D, Bodmer D, Pak K, Aletsee C, Schafers M, Dazert S, Ryan AF.** 2003. EphA4 provides repulsive signals to developing cochlear ganglion neurites mediated through ephrin-B2 and -B3. *J Comp Neurol* 462(1):90-100.
- Bruce LL, Kingsley J, Nichols DH, Fritsch B.** 1997. The development of vestibulocochlear efferents and cochlear afferents in mice. *Int J Dev Neurosci* 15(4-5):671-692.
- Bryant J, Goodyear RJ, Richardson GP.** 2002. Sensory organ development in the inner ear: molecular and cellular mechanisms. *Br Med Bull* 63:39-57.
- Burglin TR.** 1997. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res* 25(21):4173-4180.
- Cajal SR.** 1908. Terminación periférica del nervio acústico de las aves *Trab Lab Invest Biol* 6:161-176.
- Cajal SR.** 1919. Accion neurotropica de los epitelios *Trab Lab Invest Biol* 17:1-153.
- Camarero G, Leon Y, Gorospe I, De Pablo F, Alsina B, Giraldez F, Varela-Nieto I.** 2003. Insulin-like growth factor 1 is required for survival of transit-amplifying neuroblasts and differentiation of otic neurons. *Dev Biol* 262(2):242-253.
- Cambronero F, Puellas L.** 2000. Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras. *J Comp Neurol* 427(4):522-545.
- Cantos R, Cole LK, Acampora D, Simeone A, Wu DK.** 2000. Patterning of the mammalian cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22):11707-11713.
- Carney PR, Silver J.** 1983. Studies on cell migration and axon guidance in the developing distal auditory system of the mouse. *J Comp Neurol* 215(4):359-369.
- Cepko C, Ryder EF, Austin CP, Walsh C, Fekete DM.** 1995. Lineage analysis using



retrovirus vectors. *Methods Enzymol* 254:387-419.

Chalmers AD, Slack JM. 2000. The *Xenopus* tadpole gut: fate maps and morphogenetic movements. *Development* 127(2):381-392.

Chatterjee S, Kraus P, Lufkin T. 2010. A symphony of inner ear developmental control genes. *BMC Genet* 11:68.

Chen P, Johnson JE, Zoghbi HY, Segil N. 2002. The role of *Math1* in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Development* 129(10):2495-2505.

Clagett-Dame M, Knutson D. **Vitamin A in reproduction and development.** *Nutrients* 3(4):385-428.

Cobos I, Shimamura K, Rubenstein JL, Martínez S, Puelles L. 2001. Fate map of the avian anterior forebrain at the four-somite stage, based on the analysis of quail-chick chimeras. *Dev Biol* 239(1):46-67.

Cole LK, Le Roux I, Nunes F, Laufer E, Lewis J, Wu DK. 2000. Sensory organ generation in the chicken inner ear: contributions of bone morphogenetic protein 4, *serrate1*, and *lunatic fringe*. *J Comp Neurol* 424(3):509-520.

Collazo A, Bronner-Fraser M, Fraser SE. 1993. Vital dye labelling of *Xenopus laevis* trunk neural crest reveals multipotency and novel pathways of migration. *Development* 118(2):363-376.

Cowan CA, Yokoyama N, Bianchi LM, Henkemeyer M, Fritzsche B. 2000. *EphB2* guides axons at the midline and is necessary for normal vestibular function. *Neuron* 26(2):417-430.

Dabdoub A, Puligilla C, Jones JM, Fritzsche B, Cheah KS, Pevny LH, Kelley MW. 2008. *Sox2* signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47):18396-18401.

Dahmann C, Basler K. 1999. Compartment boundaries: at the edge of development. *Trends Genet* 15(8):320-326.

Dallos P. 1992. The active cochlea. *J Neurosci* 12(12):4575-4585.

D'Amico-Martel A. 1982. Temporal patterns of neurogenesis in avian cranial sensory and autonomic ganglia. *Am J Anat* 163(4):351-372.

D'Amico-Martel A, Noden DM. 1983. Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *Am J Anat* 166(4):445-468.

Daudet N, Ariza-McNaughton L, Lewis J. 2007. Notch signalling is needed to maintain, but not to initiate, the formation of prosensory patches in the chick inner ear. *Development* 134(12):2369-2378.

Dibner C, Elias S, Ofir R, Souopgui J, Kolm PJ, Sive H, Pieler T, Frank D. 2004. The *Meis3* protein and retinoid signaling interact to pattern the *Xenopus* hindbrain. *Dev Biol* 271(1):75-86.

Diez-del-Corral R, Olivera-Martinez I, Goriely A, Gale E, Maden M, Storey K. 2003. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40(1):65-79.

Diez-del-Corral R, Storey KG. 2004. Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* 26(8):857-869.

- Dominguez-Frutos E, Vendrell V, Alvarez Y, Zelarayan LC, Lopez-Hernandez I, Ros M, Schimmang T.** 2009. Tissue-specific requirements for FGF8 during early inner ear development. *Mech Dev* 126(10):873-881.
- Drescher U, Kremoser C, Handwerker C, Loschinger J, Noda M, Bonhoeffer F.** 1995. In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82(3):359-370.
- Echevarria D, Belo JA, Martinez S.** 2005. Modulation of Fgf8 activity during vertebrate brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 49(2):150-157.
- Ernfors P, Van De Water T, Loring J, Jaenisch R.** 1995. Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron* 14(6):1153-1164.
- Fantetti KN, Fekete DM.** 2012. Members of the BMP, Shh and FGF morphogen families promote chicken statoacoustic ganglion neurite outgrowth and neuron survival in vitro. *Dev Neurobiol*.
- Fantetti KN, Zou Y, Fekete DM.** 2011. Wnts and Wnt inhibitors do not influence axon outgrowth from chicken statoacoustic ganglion neurons. *Hear Res* 278(1-2):86-95.
- Farinas I, Jones KR, Tessarollo L, Vigers AJ, Huang E, Kirstein M, de Caprona DC, Coppola V, Backus C, Reichardt LF, Fritzsche B.** 2001. Spatial shaping of cochlear innervation by temporally regulated neurotrophin expression. *J Neurosci* 21(16):6170-6180.
- Fekete DM.** 1996. Cell fate specification in the inner ear. *Curr Opin Neurobiol* 6(4):533-541.
- Fekete DM, Campero AM.** 2007. Axon guidance in the inner ear. *Int J Dev Biol* 51(6-7):549-556.
- Fekete DM, Homburger SA, Waring MT, Riedl AE, Garcia LF.** 1997. Involvement of programmed cell death in morphogenesis of the vertebrate inner ear. *Development* 124(12):2451-2461.
- Fekete DM, Muthukumar S, Karagogeos D.** 1998. Hair cells and supporting cells share a common progenitor in the avian inner ear. *J Neurosci* 18(19):7811-7821.
- Fekete DM, Wu DK.** 2002. Revisiting cell fate specification in the inner ear. *Curr Opin Neurobiol* 12(1):35-42.
- Fernandez-Garre P, Rodriguez-Gallardo L, Gallego-Diaz V, Alvarez IS, Puelles L.** 2002. Fate map of the chicken neural plate at stage 4. *Development* 129(12):2807-2822.
- Ferran JL, Sanchez-Arrones L, Sandoval JE, Puelles L.** 2007. A model of early molecular regionalization in the chicken embryonic pretectum. *J Comp Neurol* 505(4):379-403.
- Fior R, Henrique D.** 2005. A novel *hes5/hes6* circuitry of negative regulation controls Notch activity during neurogenesis. *Dev Biol* 281(2):318-333.
- Frenz CM, Frenz DA.** 2011. The application of regular expression-based pattern matching to profiling the developmental factors that contribute to the development of the inner ear. *Adv Exp Med Biol* 680:165-171.
- Freyer L, Aggarwal V, Morrow BE.** 2011. Dual embryonic origin of the mammalian otic vesicle forming the inner ear. *Development* 138(24):5403-5414.
- Fritzsche B.** 1987. Inner ear of the coelacanth fish *Latimeria* has tetrapod affinities. *Nature* 327(6118):153-154.
- Fritzsche B.** 2003. Development of inner ear afferent connections: forming primary neurons and connecting them to the



developing sensory epithelia. *Brain Res Bull* 60(5-6):423-433.

Fritzsche B, Beisel KW. 2001. Evolution and development of the vertebrate ear. *Brain Res Bull* 55(6):711-721.

Fritzsche B, Beisel KW, Hansen LA. 2006. The molecular basis of neurosensory cell formation in ear development: a blueprint for hair cell and sensory neuron regeneration? *Bioessays* 28(12):1181-1193.

Fritzsche B, Beisel KW, Jones K, Farinas I, Maklad A, Lee J, Reichardt LF. 2002. Development and evolution of inner ear sensory epithelia and their innervation. *J Neurobiol* 53(2):143-156.

Fritzsche B, Eberl DF, Beisel KW. 2010. The role of bHLH genes in ear development and evolution: revisiting a 10-year-old hypothesis. *Cell Mol Life Sci* 67(18):3089-3099.

Fritzsche B, Matei VA, Nichols DH, Bermingham N, Jones K, Beisel KW, Wang VY. 2005. *Atoh1* null mice show directed afferent fiber growth to undifferentiated ear sensory epithelia followed by incomplete fiber retention. *Dev Dyn* 233(2):570-583.

Fritzsche B, Pirvola U, Ylikoski J. 1999. Making and breaking the innervation of the ear: neurotrophic support during ear development and its clinical implications. *Cell Tissue Res* 295(3):369-382.

Fritzsche B, Silos-Santiago I, Bianchi LM, Farinas I. 1997. The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation. *Trends Neurosci* 20(4):159-164.

Fritzsche B, Wake MH. 1988. The inner ear of gymnophine amphibians and its nerve supply: a comparative study of regressive events in a complex sensory system (Amphibia, Gymnophina). *Zoomorphology* 108:201-217.

Garcia-Lopez R, Vieira C, Echevarria D, Martinez S. 2004. Fate map of the diencephalon and the zona limitans at the 10-somites stage in chick embryos. *Dev Biol* 268(2):514-530.

Gavalas A. 2002. Arranging the hindbrain. *Trends Neurosci* 25(2):61-64.

Gimlich RL. 1986. Acquisition of developmental autonomy in the equatorial region of the *Xenopus* embryo. *Dev Biol* 115(2):340-352.

Goodyear RJ, Kwan T, Oh SH, Raphael Y, Richardson GP. 2001. The cell adhesion molecule BEN defines a prosensory patch in the developing avian otocyst. *J Comp Neurol* 434(3):275-288.

Groves AK, Bronner-Fraser M. 2000. Competence, specification and commitment in otic placode induction. *Development* 127(16):3489-3499.

Groves AK, Fekete DM. 2012. Shaping sound in space: the regulation of inner ear patterning. *Development* 139(2):245-257.

Gu C, Rodriguez ER, Reimert DV, Shu T, Fritzsche B, Richards LJ, Kolodkin AL, Ginty DD. 2003. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell* 5(1):45-57.

Hackett L, Gao, W. and Raz, Y. 2007. Robo protein is expressed in the developing spiral ganglion during neurite outgrowth. *Assoc Res Otolaryngol Abs*:192.

Haddon C, Lewis J. 1996. Early ear development in the embryo of the zebrafish, *Danio rerio*. *J Comp Neurol* 365(1):113-128.

Hallbook F, Ibanez CF, Ebendal T, Persson H. 1993. Cellular localization of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3

- mRNA expression in the early chicken embryo. *Eur J Neurosci* 5(1):1-14.
- Hamburger V, Hamilton HL.** 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn* 195:231-272.
- Hammond KL, Whitfield TT.** 2006. The developing lamprey ear closely resembles the zebrafish otic vesicle: *otx1* expression can account for all major patterning differences. *Development* 133(7):1347-1357.
- Hammond KL, Whitfield TT.** 2011. Fgf and Hh signalling act on a symmetrical pre-pattern to specify anterior and posterior identity in the zebrafish otic placode and vesicle. *Development* 138(18):3977-3987.
- Harrison RG.** 1936. Relations of Symmetry in the Developing Ear of *Amblystoma punctatum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22(4):238-247.
- Heisenberg CP, Solnica-Krezel L.** 2008. Back and forth between cell fate specification and movement during vertebrate gastrulation. *Curr Opin Genet Dev* 18(4):311-316.
- Hemond SG, Morest DK.** 1991. Ganglion formation from the otic placode and the otic crest in the chick embryo: mitosis, migration, and the basal lamina. *Anat Embryol (Berl)* 184(1):1-13.
- Hemond SG, Morest DK.** 1992. Tropic effects of otic epithelium on cochleo-vestibular ganglion fiber growth in vitro. *Anat Rec* 232(2):273-284.
- Hidalgo-Sanchez M, Simeone A, Alvarado-Mallart RM.** 1999. Fgf8 and Gbx2 induction concomitant with *Otx2* repression is correlated with midbrain-hindbrain fate of caudal prosencephalon. *Development* 126(14):3191-3203.
- Hidalgo-Sanchez M, Alvarado-Mallart R, Alvarez IS.** 2000. Pax2, *Otx2*, Gbx2 and Fgf8 expression in early otic vesicle development. *Mech Dev* 95(1-2):225-229.
- Hidalgo-Sanchez M, Millet S, Bloch-Gallego E, Alvarado-Mallart RM.** 2005. Specification of the meso-isthmo-cerebellar region: the *Otx2*/*Gbx2* boundary. *Brain Res Brain Res Rev* 49(2):134-149.
- Hill J, Clarke JD, Vargesson N, Jowett T, Holder N.** 1995. Exogenous retinoic acid causes specific alterations in the development of the midbrain and hindbrain of the zebrafish embryo including positional respecification of the Mauthner neuron. *Mech Dev* 50(1):3-16.
- Hisa T, Spence SE, Rachel RA, Fujita M, Nakamura T, Ward JM, Devor-Henneman DE, Saiki Y, Kutsuna H, Tessarollo L, Jenkins NA, Copeland NG.** 2004. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in *Meis1* mutant animals. *EMBO J* 23(2):450-459.
- Holmes G, Niswander L.** 2001. Expression of slit-2 and slit-3 during chick development. *Dev Dyn* 222(2):301-307.
- Hume CR, Bratt DL, Oesterle EC.** 2007. Expression of LHX3 and SOX2 during mouse inner ear development. *Gene Expr Patterns* 7(7):798-807.
- Jackler RK, Luxford WM, Schindler RA, McKerrow WS.** 1987. Cochlear patency problems in cochlear implantation. *Laryngoscope* 97(7 Pt 1):801-805.
- Jones JM, Warchol ME.** 2009. Expression of the Gata3 transcription factor in the acoustic ganglion of the developing avian inner ear. *J Comp Neurol* 516(6):507-518.
- Karis A, Pata I, van Doorninck JH, Grosveld F, de Zeeuw CI, de Caprona D, Fritzsche B.** 2001. Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects



morphogenesis of the ear. *J Comp Neurol* 429(4):615-630.

Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, Brough DE, Raphael Y. 2003. Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J Neurosci* 23(11):4395-4400.

Kelly M, Chen P. 2007. Shaping the mammalian auditory sensory organ by the planar cell polarity pathway. *Int J Dev Biol* 51(6-7):535-547.

Kelly MC, Chen P. 2009. Development of form and function in the mammalian cochlea. *Curr Opin Neurobiol* 19(4):395-401.

Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78(3):425-435.

Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G. 1998. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92(2):205-215.

Kiernan AE, Ahituv N, Fuchs H, Balling R, Avraham KB, Steel KP, Hrabe de Angelis M. 2001. The Notch ligand Jagged1 is required for inner ear sensory development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):3873-3878.

Kiernan AE, Nunes F, Wu DK, Fekete DM. 1997. The expression domain of two related homeobox genes defines a compartment in the chicken inner ear that may be involved in semicircular canal formation. *Dev Biol* 191(2):215-229.

Kiernan AE, Pelling AL, Leung KK, Tang AS, Bell DM, Tease C, Lovell-Badge R, Steel KP, Cheah KS. 2005. Sox2 is required for sensory organ development in the

mammalian inner ear. *Nature* 434(7036):1031-1035.

Kiernan AE, Xu J, Gridley T. 2006. The Notch ligand JAG1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *PLoS Genet* 2(1):e4.

Kil SH, Collazo A. 2001. Origins of inner ear sensory organs revealed by fate map and time-lapse analyses. *Dev Biol* 233(2):365-379.

Kil SH, Collazo A. 2002. A review of inner ear fate maps and cell lineage studies. *J Neurobiol* 53(2):129-142.

Kil SH, Streit A, Brown ST, Agrawal N, Collazo A, Zile MH, Groves AK. 2005. Distinct roles for hindbrain and paraxial mesoderm in the induction and patterning of the inner ear revealed by a study of vitamin-A-deficient quail. *Dev Biol* 285(1):252-271.

Kim WY, Frittsch B, Serls A, Bakel LA, Huang EJ, Reichardt LF, Barth DS, Lee JE. 2001. NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development* 128(3):417-426.

Knights V, Cook SJ. 2010. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther* 125(1):105-117.

Knowlton VY. 1967. Effects of extraembryonic membrane deficiency on differentiation of the embryonic avian brain and sense organs. *Acta Anat (Basel)* 66(3):420-445.

Kolodkin AL, Matthes DJ, O'Connor TP, Patel NH, Admon A, Bentley D, Goodman CS. 1992. Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 9(5):831-845.

- Koppl C.** 2001. Efferent axons in the avian auditory nerve. *Eur J Neurosci* 13(10):1889-1901.
- Koundakjian EJ, Appler JL, Goodrich LV.** 2007. Auditory neurons make stereotyped wiring decisions before maturation of their targets. *J Neurosci* 27(51):14078-14088.
- Kozlowski DJ, Murakami T, Ho RK, Weinberg ES.** 1997. Regional cell movement and tissue patterning in the zebrafish embryo revealed by fate mapping with caged fluorescein. *Biochem Cell Biol* 75(5):551-562.
- Ladher RK, Anakwe KU, Gurney AL, Schoenwolf GC, Francis-West PH.** 2000. Identification of synergistic signals initiating inner ear development. *Science* 290(5498):1965-1967.
- Ladher RK, Wright TJ, Moon AM, Mansour SL, Schoenwolf GC.** 2005. FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse. *Genes Dev* 19(5):603-613.
- Lang H, Bever MM, Fekete DM.** 2000. Cell proliferation and cell death in the developing chick inner ear: spatial and temporal patterns. *J Comp Neurol* 417(2):205-220.
- Lang H, Fekete DM.** 2001. Lineage analysis in the chicken inner ear shows differences in clonal dispersion for epithelial, neuronal, and mesenchymal cells. *Dev Biol* 234(1):120-137.
- Lang H, Schulte BA, Schmiedt RA.** 2002. Endocochlear potentials and compound action potential recovery: functions in the C57BL/6J mouse. *Hear Res* 172(1-2):118-126.
- Laufer E, Dahn R, Orozco OE, Yeo CY, Pisenti J, Henrique D, Abbott UK, Fallon JF, Tabin C.** 1997. Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature* 386(6623):366-373.
- Lawoko-Kerali G, Rivolta MN, Lawlor P, Cacciabue-Rivolta DI, Langton-Hewer C, van Doorninck JH, Holley MC.** 2004. GATA3 and NeuroD distinguish auditory and vestibular neurons during development of the mammalian inner ear. *Mech Dev* 121(3):287-299.
- Le Douarin N.** 1969. [Details of the interphase nucleus in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)]. *Bull Biol Fr Belg* 103(3):435-452.
- Le Douarin NM.** 2008. Developmental patterning deciphered in avian chimeras. *Dev Growth Differ* 50 Suppl 1:S11-28.
- Leger S, Brand M.** 2002. Fgf8 and Fgf3 are required for zebrafish ear placode induction, maintenance and inner ear patterning. *Mech Dev* 119(1):91-108.
- Leon Y, Sanchez-Galiano S, Gorospe I.** 2004. Programmed cell death in the development of the vertebrate inner ear. *Apoptosis* 9(3):255-264.
- Lewis CM.** 1985. The vertebrate inner ear. Boca Raton:248.
- Lewis ER.** 1987. Speculations about noise and the evolution of vertebrate hearing. *Hear Res* 25(1):83-90.
- Li CW, Van De Water TR, Ruben RJ.** 1978. The fate mapping of the eleventh and twelfth day mouse otocyst: an in vitro study of the sites of origin of the embryonic inner ear sensory structures. *J Morphol* 157(3):249-267.
- Li H, Liu H, Sage C, Huang M, Chen ZY, Heller S.** 2004. Islet-1 expression in the developing chicken inner ear. *J Comp Neurol* 477(1):1-10.
- Li JY, Joyner AL.** 2001. Otx2 and Gbx2 are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Development* 128(24):4979-4991.



- Lilleväli K, Haugas M, Matilainen T, Pussinen C, Karis A, Salminen M.** 2006. Gata3 is required for early morphogenesis and Fgf10 expression during otic development. *Mech Dev* 123(6):415-429.
- Lilleväli K, Haugas M, Pituello F, Salminen M.** 2007. Comparative analysis of Gata3 and Gata2 expression during chicken inner ear development. *Dev Dyn* 236(1):306-313.
- Lilleväli K, Matilainen T, Karis A, Salminen M.** 2004. Partially overlapping expression of Gata2 and Gata3 during inner ear development. *Dev Dyn* 231(4):775-781.
- Liu M, Pereira FA, Price SD, Chu MJ, Shope C, Himes D, Eatock RA, Brownell WE, Lysakowski A, Tsai MJ.** 2000. Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems. *Genes Dev* 14(22):2839-2854.
- Liu W, Levi G, Shanske A, Frenz DA.** 2008. Retinoic acid-induced inner ear teratogenesis caused by defective Fgf3/Fgf10-dependent Dlx5 signaling. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 83(2):134-144.
- Lorente de No R.** 1926. Etudes sur l'anatomie et la physiologie du labyrinthe de l'oreille et du VIII nerf. II. Quelques données au sujet de l'anatomie des organes sensoriels du labyrinthe. *Trav Lab Rech Biol* 24:53-153.
- Lorente de No R.** 1933. Anatomy of the eighth nerve: the central projections of the nerve endings of the internal ear. *Laryngoscope* 43:1-38.
- Luo Y, Raible D, Raper JA.** 1993. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75(2):217-227.
- Ma Q, Anderson DJ, Fritzsche B.** 2000. Neurogenin 1 null mutant ears develop fewer, morphologically normal hair cells in smaller sensory epithelia devoid of innervation. *J Assoc Res Otolaryngol* 1(2):129-143.
- Marin F, Puelles L.** 1995. Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur J Neurosci* 7(8):1714-1738.
- Mark M, Chambon P.** 2003. Functions of RARs and RXRs in vivo: genetic dissection of the retinoid signaling pathway. *Pure Appl Chem* 75:1709-1732.
- Marklund M, Sjödal M, Beehler BC, Jessell TM, Edlund T, Gunhaga L.** 2004. Retinoic acid signalling specifies intermediate character in the developing telencephalon. *Development* 131(17):4323-4332.
- Marovitz WF, Shugar JM, Khan KM.** 1976. The role of cellular degeneration in the normal development of (rat) otocyst. *Laryngoscope* 86(9):1413-1425.
- Martin K, Groves AK.** 2006. Competence of cranial ectoderm to respond to Fgf signaling suggests a two-step model of otic placode induction. *Development* 133(5):877-887.
- Martin P, Swanson GJ.** 1993. Descriptive and experimental analysis of the epithelial remodellings that control semicircular canal formation in the developing mouse inner ear. *Dev Biol* 159(2):549-558.
- Martinez S, Alvarado-Mallart RM.** 1989. Transplanted mesencephalic quail cells colonize selectively all primary visual nuclei of chick diencephalon: a study using heterotopic transplants. *Brain Res Dev Brain Res* 47(2):263-274.
- Martinez S, Puelles L, Alvarado-Mallart RM.** 1992. Tangential neuronal migration in the avian tectum: cell type identification and mapping of regional differences with quail/chick homotopic transplants. *Brain Res Dev Brain Res* 66(2):153-163.

- Matei V, Pauley S, Kaing S, Rowitch D, Beisel KW, Morris K, Feng F, Jones K, Lee J, Fritzsche B.** 2005. Smaller inner ear sensory epithelia in Neurog 1 null mice are related to earlier hair cell cycle exit. *Dev Dyn* 234(3):633-650.
- Matsuo I, Kuratani S, Kimura C, Takeda N, Aizawa S.** 1995. Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev* 9(21):2646-2658.
- Mayordomo R, Rodriguez-Gallardo L, Alvarez IS.** 1998. Morphological and quantitative studies in the otic region of the neural tube in chick embryos suggest a neuroectodermal origin for the otic placode. *J Anat* 193 (Pt 1):35-48.
- Meinhardt H.** 1983a. A boundary model for pattern formation in vertebrate limbs. *J Embryol Exp Morphol* 76:115-137.
- Meinhardt H.** 1983b. Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields. *Dev Biol* 96(2):375-385.
- Meinhardt H.** 2008. Models of biological pattern formation: from elementary steps to the organization of embryonic axes. *Curr Top Dev Biol* 81:1-63.
- Mercader N, Leonardo E, Piedra ME, Martinez AC, Ros MA, Torres M.** 2000. Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* 127(18):3961-3970.
- Mercader N, Tanaka EM, Torres M.** 2005. Proximodistal identity during vertebrate limb regeneration is regulated by Meis homeodomain proteins. *Development* 132(18):4131-4142.
- Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Ganan Y, Economides AN, Hurlé JM.** 1999. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* 126(23):5515-5522.
- Millet S, Bloch-Gallego E, Simeone A, Alvarado-Mallart RM.** 1996. The caudal limit of Otx2 gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using in situ hybridisation and chick/quail homotopic grafts. *Development* 122(12):3785-3797.
- Millimaki BB, Sweet EM, Dhasan MS, Riley BB.** 2007. Zebrafish *atoh1* genes: classic proneural activity in the inner ear and regulation by Fgf and Notch. *Development* 134(2):295-305.
- Millimaki BB, Sweet EM, Riley BB.** 2010. Sox2 is required for maintenance and regeneration, but not initial development, of hair cells in the zebrafish inner ear. *Dev Biol* 338(2):262-269.
- Miyazaki N, Furuyama T, Takeda N, Inoue T, Kubo T, Inagaki S.** 1999. Expression of mouse semaphorin H mRNA in the inner ear of mouse fetuses. *Neurosci Lett* 261(1-2):127-129.
- Morsli H, Choo D, Ryan A, Johnson R, Wu DK.** 1998. Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. *J Neurosci* 18(9):3327-3335.
- Morsli H, Tuorto F, Choo D, Postiglione MP, Simeone A, Wu DK.** 1999. Otx1 and Otx2 activities are required for the normal development of the mouse inner ear. *Development* 126(11):2335-2343.
- Murakami Y, Suto F, Shimizu M, Shinoda T, Kameyama T, Fujisawa H.** 2001. Differential expression of plexin-A subfamily members in the mouse nervous system. *Dev Dyn* 220(3):246-258.
- Nagy, N., and Olah, I.** 2010. Experimental evidence for the ectodermal origin of the



epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius. *Development* 137, 3019-3023.

Neves J, Kamaid A, Alsina B, Giraldez F. 2007. Differential expression of Sox2 and Sox3 in neuronal and sensory progenitors of the developing inner ear of the chick. *J Comp Neurol* 503(4):487-500.

Neves J, Parada C, Chamizo M, Giraldez F. 2011. Jagged 1 regulates the restriction of Sox2 expression in the developing chicken inner ear: a mechanism for sensory organ specification. *Development* 138(4):735-744.

Neves J, Uchikawa M, Bigas A, Giraldez F. 2012. The prosensory function of Sox2 in the chicken inner ear relies on the direct regulation of Atoh1. *PLoS One* 7(1):e30871.

Nikolic P, Jarlebark LE, Billett TE, Thorne PR. 2000. Apoptosis in the developing rat cochlea and its related structures. *Brain Res Dev Brain Res* 119(1):75-83.

Nishikori T, Hatta T, Kawauchi H, Otani H. 1999. Apoptosis during inner ear development in human and mouse embryos: an analysis by computer-assisted three-dimensional reconstruction. *Anat Embryol (Berl)* 200(1):19-26.

Nishizaki K, Anniko M, Orita Y, Masuda Y, Yoshino T, Kanda S, Sasaki J. 1998. Programmed cell death in the development of the mouse external auditory canal. *Anat Rec* 252(3):378-382.

Noden DM, van de Water, T.R. 1986. The developing ear: tissue origins and interactions. *The Biology of Change in Otolaryngology*:15-46.

Nornes HO, Dressler GR, Knapik EW, Deutsch U, Gruss P. 1990. Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development* 109(4):797-809.

Novitsch BG, Wichterle H, Jessell TM, Sockanathan S. 2003. A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron* 40(1):81-95.

Oh SH, Johnson R, Wu DK. 1996. Differential expression of bone morphogenetic proteins in the developing vestibular and auditory sensory organs. *J Neurosci* 16(20):6463-6475.

Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N. 2000. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun* 277(3):643-649.

Ohuchi H, Yasue A, Ono K, Sasaoka S, Tomonari S, Takagi A, Itakura M, Moriyama K, Noji S, Nohno T. 2005. Identification of cis-element regulating expression of the mouse Fgf10 gene during inner ear development. *Dev Dyn* 233(1):177-187.

Ohyama T, Groves AK, Martin K. 2007. The first steps towards hearing: mechanisms of otic placode induction. *Int J Dev Biol* 51(6-7):463-472.

O'Rahilly R. 1963. The Early Development of the Otic Vesicle in Staged Human Embryos. *J Embryol Exp Morphol* 11:741-755.

Pauley S, Wright TJ, Pirvola U, Ornitz D, Beisel K, Fritzsche B. 2003. Expression and function of FGF10 in mammalian inner ear development. *Dev Dyn* 227(2):203-215.

Perez SE, Rebelo S, Anderson DJ. 1999. Early specification of sensory neuron fate revealed by expression and function of neurogenins in the chick embryo. *Development* 126(8):1715-1728.

- Perkins RE, Morest DK.** 1975. A study of cochlear innervation patterns in cats and rats with the Golgi method and Nomarski Optics. *J Comp Neurol* 163(2):129-158.
- Phillips BT, Bolding K, Riley BB.** 2001. Zebrafish *fgf3* and *fgf8* encode redundant functions required for otic placode induction. *Dev Biol* 235(2):351-365.
- Pieper M, Eagleson GW, Wosniok W, Schlosser G.** 2011. Origin and segregation of cranial placodes in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 360(2):257-275.
- Pirvola U, Spencer-Dene B, Xing-Qun L, Kettunen P, Thesleff I, Fritzsche B, Dickson C, Ylikoski J.** 2000. FGF/FGFR-2(IIIb) signaling is essential for inner ear morphogenesis. *J Neurosci* 20(16):6125-6134.
- Pirvola U, Ylikoski J, Palgi J, Lehtonen E, Arumae U, Saarman M.** 1992. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNAs in the peripheral target fields of developing inner ear ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20):9915-9919.
- Polanska UM, Fernig DG, Kinnunen T.** 2009. Extracellular interactome of the FGF receptor-ligand system: complexities and the relative simplicity of the worm. *Dev Dyn* 238(2):277-293.
- Pombero A, Martinez S.** 2009. Telencephalic morphogenesis during the process of neurulation: an experimental study using quail-chick chimeras. *J Comp Neurol* 512(6):784-797.
- Pourquie O, Coltey M, Thomas JL, Le Douarin NM.** 1990. A widely distributed antigen developmentally regulated in the nervous system. *Development* 109(4):743-752.
- Puelles L, Martínez-de-la-Torre, M., Paxinos, G., Watson, C. and Martínez, S.** 2007. The Chick Brain in Stereotaxic Coordinates. An Atlas featuring Neuromeric Subdivisions and Mammalian Homologies.
- Puelles L, Fernandez-Garre P, Sanchez-Arrones L, Garcia-Calero E, Rodriguez-Gallardo L.** 2005. Correlation of a chicken stage 4 neural plate fate map with early gene expression patterns. *Brain Res Brain Res Rev* 49(2):167-178.
- Pujades C, Kamaid A, Alsina B, Giraldez F.** 2006. BMP-signaling regulates the generation of hair-cells. *Dev Biol* 292(1):55-67.
- Purves DA, GJ; Fitzpatrick, D; Hall, WC; Lamantia, A-S; Mcnamara, JO and Williams, SM.** 2007. Neurociencia. Editorial Médica Panamericana 3ª Edición.
- Qin P, Cimildoro R, Kochhar DM, Soprano KJ, Soprano DR.** 2002. PBX, MEIS, and IGF-I are potential mediators of retinoic acid-induced proximodistal limb reduction defects. *Teratology* 66(5):224-234.
- Radde-Gallwitz K, Pan L, Gan L, Lin X, Segil N, Chen P.** 2004. Expression of *Islet1* marks the sensory and neuronal lineages in the mammalian inner ear. *J Comp Neurol* 477(4):412-421.
- Raft S, Koundakjian EJ, Quinones H, Jayasena CS, Goodrich LV, Johnson JE, Segil N, Groves AK.** 2007. Cross-regulation of *Ngn1* and *Math1* coordinates the production of neurons and sensory hair cells during inner ear development. *Development* 134(24):4405-4415.
- Raft S, Nowotschin S, Liao J, Morrow BE.** 2004. Suppression of neural fate and control of inner ear morphogenesis by *Tbx1*. *Development* 131(8):1801-1812.
- Represa J, Leon Y, Miner C, Giraldez F.** 1991. The *int-2* proto-oncogene is responsible for induction of the inner ear. *Nature* 353(6344):561-563.



- Represa JJ, Moro JA, Gato A, Pastor F, Barbosa E.** 1990. Patterns of epithelial cell death during early development of the human inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99(6 Pt 1):482-488.
- Retzius G.** 1983. Zur entwicklung der zellen des ganglion spirale acustici und zur endigungsweise des gehörnerven bei den säugethieren. *Biol Untersuch* 4:52-57.
- Rhinn M, Dolle P.** 2012. Retinoic acid signalling during development. *Development* 139(5):843-858.
- Riccomagno MM, Takada S, Epstein DJ.** 2005. Wnt-dependent regulation of inner ear morphogenesis is balanced by the opposing and supporting roles of Shh. *Genes Dev* 19(13):1612-1623.
- Rinkwitz-Brandt S, Arnold HH, Bober E.** 1996. Regionalized expression of Nkx5-1, Nkx5-2, Pax2 and sek genes during mouse inner ear development. *Hear Res* 99(1-2):129-138.
- Rodriguez-Esteban C, Schwabe JW, De La Pena J, Foys B, Eshelman B, Izpisua Belmonte JC.** 1997. Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature* 386(6623):360-366.
- Rodriguez-Gallardo L, Sanchez-Arrones L, Fernandez-Garre P, Puelles L.** 2005. Agreement and disagreement among fate maps of the chick neural plate. *Brain Res Brain Res Rev* 49(2):191-201.
- Romand R, Dolle P, Hashino E.** 2006. Retinoid signaling in inner ear development. *J Neurobiol* 66(7):687-704.
- Romand R, Kondo T, Fraulob V, Petkovich M, Dolle P, Hashino E.** 2006. Dynamic expression of retinoic acid-synthesizing and -metabolizing enzymes in the developing mouse inner ear. *J Comp Neurol* 496(5):643-654.
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM.** 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80(3):1021-1054.
- Rubel EW, Fritsch B.** 2002. Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annu Rev Neurosci* 25:51-101.
- Ruben RJ.** 1967. Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Otolaryngol:Suppl* 220:221-244.
- Sanchez-Calderon H, Martin-Partido G, Hidalgo-Sanchez M.** 2002. Differential expression of Otx2, Gbx2, Pax2, and Fgf8 in the developing vestibular and auditory sensory organs. *Brain Res Bull* 57(3-4):321-323.
- Sanchez-Calderon H, Martin-Partido G, Hidalgo-Sanchez M.** 2004. Otx2, Gbx2, and Fgf8 expression patterns in the chick developing inner ear and their possible roles in otic specification and early innervation. *Gene Expr Patterns* 4(6):659-669.
- Sanchez-Calderon H, Martin-Partido G, Hidalgo-Sanchez M.** 2005a. Pax2 expression patterns in the developing chick inner ear. *Gene Expr Patterns* 5(6):763-773.
- Sánchez-Calderón H.** 2005b. Diferenciación de los elementos vestibulares y cocleares del oído interno de vertebrados. Tesis Doctoral Universidad de Extremadura.
- Sanchez-Calderon H, Francisco-Morcillo J, Martin-Partido G, Hidalgo-Sanchez M.** 2007a. Fgf19 expression patterns in the developing chick inner ear. *Gene Expr Patterns* 7(1-2):30-38.
- Sanchez-Calderon H, Milo M, Leon Y, Varela-Nieto I.** 2007b. A network of growth

- and transcription factors controls neuronal differentiation and survival in the developing ear. *Int J Dev Biol* 51(6-7):557-570.
- Sanchez-Guardado LO, Ferran JL, Mijares J, Puelles L, Rodriguez-Gallardo L, Hidalgo-Sanchez M.** 2009. Raldh3 gene expression pattern in the developing chicken inner ear. *J Comp Neurol* 514(1):49-65.
- Sanchez-Guardado LO, Ferran JL, Rodriguez-Gallardo L, Puelles L, Hidalgo-Sanchez M.** 2011a. Meis gene expression patterns in the developing chicken inner ear. *J Comp Neurol* 519(1):125-147.
- Sanchez-Guardado LO, Irimia M, Sanchez-Arrones L, Burguera D, Rodriguez-Gallardo L, Garcia-Fernandez J, Puelles L, Ferran JL, Hidalgo-Sanchez M.** 2011b. Distinct and redundant expression and transcriptional diversity of MEIS gene paralogs during chicken development. *Dev Dyn* 240(6):1475-1492.
- Sánchez-Guardado LO, Puelles, L., Hidalgo-Sánchez, M.** 2012. Fgf10 expression patterns in the developing chick inner ear. *J Comp Neurol*.
- Sanes JR.** 1994. Lineage tracing. The latest in lineage. *Curr Biol* 4(12):1162-1164.
- Satoh T, Fekete DM.** 2005. Clonal analysis of the relationships between mechanosensory cells and the neurons that innervate them in the chicken ear. *Development* 132(7):1687-1697.
- Schimmang T.** 2012. Transcription factors that control inner ear development and their potential for transdifferentiation and reprogramming. *Hear Res*.
- Schimmang T.** 2007. Expression and functions of FGF ligands during early otic development. *Int J Dev Biol* 51(6-7):473-481.
- Schlosser G, Ahrens K.** 2004. Molecular anatomy of placode development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 271(2):439-466.
- Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS.** 1993. Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10(3):409-426.
- Selleck MA, Bronner-Fraser M.** 1995. Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development* 121(2):525-538.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M.** 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78(3):409-424.
- Sienknecht UJ, Fekete DM.** 2008. Comprehensive Wnt-related gene expression during cochlear duct development in chicken. *J Comp Neurol* 510(4):378-395.
- Sienknecht UJ, Fekete DM.** 2009. Mapping of Wnt, frizzled, and Wnt inhibitor gene expression domains in the avian otic primordium. *J Comp Neurol* 517(6):751-764.
- Simeone A, Puelles E, Acampora D.** 2002. The Otx family. *Curr Opin Genet Dev* 12(4):409-415.
- Simmons DD.** 2002. Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *J Neurobiol* 53(2):228-250.
- Stevens CB, Davies AL, Battista S, Lewis JH, Fekete DM.** 2003. Forced activation of Wnt signaling alters morphogenesis and sensory organ identity in the chicken inner ear. *Dev Biol* 261(1):149-164.
- Storey KG, Crossley JM, De Robertis EM, Norris WE, Stern CD.** 1992. Neural induction and regionalisation in the chick embryo. *Development* 114(3):729-741.



- Streit A.** 2002. Extensive cell movements accompany formation of the otic placode. *Dev Biol* 249(2):237-254.
- Streit A.** 2004. Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Dev Biol* 276(1):1-15.
- Sweet EM, Vemaraju S, Riley BB.** 2011. Sox2 and Fgf interact with Atoh1 to promote sensory competence throughout the zebrafish inner ear. *Dev Biol* 358(1):113-121.
- Tan K, Le Douarin NM.** 1991. Development of the nuclei and cell migration in the medulla oblongata. Application of the quail-chick chimera system. *Anat Embryol (Berl)* 183(4):321-343.
- Tanaka H, Kinutani M, Agata A, Takashima Y, Obata K.** 1990. Pathfinding during spinal tract formation in the chick-quail chimera analysed by species-specific monoclonal antibodies. *Development* 110(2):565-571.
- Torres M, Giraldez F.** 1998. The development of the vertebrate inner ear. *Mech Dev* 71(1-2):5-21.
- Torres M, Gomez-Pardo E, Gruss P.** 1996. Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development* 122(11):3381-3391.
- Uchikawa M, Kamachi Y, Kondoh H.** 1999. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech Dev* 84(1-2):103-120.
- Vaage S.** 1969. The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). A morphological, histochemical and autoradiographical investigation. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* 41(3):3-87.
- Vendrell V, Vazquez-Echeverria C, Lopez-Hernandez I, Alonso BD, Martinez S, Pujades C, Schimmang T.** 2012. Roles of Wnt8a during formation and patterning of the mouse inner ear. *Mech Dev*.
- Von Békésy G.** 1960. Experiments in Hearing. New York: McGraw-Hill A collection of von Békésy's original papers
- Waterman RE, Bell DH.** 1984. Epithelial fusion during early semicircular canal formation in the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Anat Rec* 210(1):101-114.
- Webber A, Raz Y.** 2006. Axon guidance cues in auditory development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288(4):390-396.
- Whitehead MC, Morest DK.** 1985. The development of innervation patterns in the avian cochlea. *Neuroscience* 14(1):255-276.
- Whitehead MC, Morest DK.** 1985. The growth of cochlear fibers and the formation of their synaptic endings in the avian inner ear: a study with the electron microscope. *Neuroscience* 14(1):277-300.
- Whitfield T, Haddon C, Lewis J.** 1997. Intercellular signals and cell-fate choices in the developing inner ear: origins of global and of fine-grained pattern. *Semin Cell Dev Biol* 8(3):239-247.
- Whitfield TT, Hammond KL.** 2007. Axial patterning in the developing vertebrate inner ear. *Int J Dev Biol* 51(6-7):507-520.
- Wikstrom SO, Anniko M.** 1987. Early development of the stato-acoustic and facial ganglia. *Acta Otolaryngol* 104(1-2):166-174.
- Wilson L, Maden M.** 2005. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282(1):1-13.
- Wittler L, Kessel M.** 2004. The acquisition of neural fate in the chick. *Mech Dev* 121(9):1031-1042.

Wu DK, Oh SH. 1996. Sensory organ generation in the chick inner ear. *J Neurosci* 16(20):6454-6462.

Xiang M, Maklad A, Pirvola U, Fritzsche B. 2003. Brn3c null mutant mice show long-term, incomplete retention of some afferent inner ear innervation. *BMC Neurosci* 4:2.

Yamada T, Placzek M, Tanaka H, Dodd J, Jessell TM. 1991. Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64(3):635-647.

Yashiro K, Zhao X, Uehara M, Yamashita K, Nishijima M, Nishino J, Saijoh Y, Sakai Y, Hamada H. 2004. Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Dev Cell* 6(3):411-422.

Zerucha T, Prince VE. 2001. Cloning and developmental expression of a zebrafish *meis2* homeobox gene. *Mech Dev* 102(1-2):247-250.

Zheng JL, Gao WQ. 1997. Analysis of rat vestibular hair cell development and regeneration using calretinin as an early marker. *J Neurosci* 17(21):8270-8282.

Zheng JL, Gao WQ. 2000. Overexpression of *Math1* induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat Neurosci* 3(6):580-586.

Zine A, Aubert A, Qiu J, Therianos S, Guillemot F, Kageyama R, de Ribaupierre F. 2001. *Hes1* and *Hes5* activities are required for the normal development of the hair cells in the mammalian inner ear. *J Neurosci* 21(13):4712-4720.